



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0619234-3 A2**

(22) Data de Depósito: 30/11/2006  
(43) Data da Publicação: 08/11/2011  
(RPI 2131)



(51) *Int.Cl.:*  
G01N 33/566

**(54) Título:** MÉTODO E APARELHO PARA DETECTAR ANTÍGENO SOLÚVEL, MÉTODO E APARELHO PARA DETECTAR PARTÍCULA ALVO E MÉTODO PARA IDENTIFICAR UMA PATOGENIA EM PLANTAS

**(30) Prioridade Unionista:** 30/11/2005 US 60/741,271

**(73) Titular(es):** Massachusetts Institute of Technology

**(72) Inventor(es):** Allan Heff, Bernadette Johnson, Eric Schwoebel, Frances Nargi, James Harper, Joseph Lacirignola, Kristine Hogan, Mark Hennessy, Mark Hollis, Martha S. Petrovick, Richard Mathews, Songeeta Palchadhuri, Todd Rider, Trina Vian

**(74) Procurador(es):** Vieira de Mello Advogados

**(86) Pedido Internacional:** PCT US2006045691 de 30/11/2006

**(87) Publicação Internacional:** WO 2008/048300 de 24/04/2008

**(57) Resumo:** MÉTODO E APARELHO PARA DETECTAR ANTÍGENO SOLÚVEL, MÉTODO E APARELHO PARA DETECTAR PARTÍCULA ALVO E MÉTODO PARA IDENTIFICAR UMA PATOGENIA EM PLANTAS. A presente invenção refere-se a métodos para a detecção de partículas alvo, tais como patogenicias, antígenos solúveis, ácidos nucléicos, toxinas, produtos químicos, patogenicias de plantas, patogenicias de transmissão sanguínea, bactéria, vírus e similares. A invenção descreve ainda uma célula emissora que compreende um receptor, sendo que o receptor pode ser um anticorpo ou receptor Fc, e uma molécula emissora para detectar uma partícula alvo em uma amostra onde a partícula alvo a ser detectada é ligada por um ou mais receptores à célula emissora. São descritos ainda aparelhos sensores opticoeletrônicos para detectar uma partícula alvo em uma amostra, incluindo em uma pluralidade de amostras.

**MÉTODO E APARELHO PARA DETECTAR ANTÍGENO SOLÚVEL, MÉTODO E**  
**APARELHO PARA DETECTAR PARTÍCULA ALVO E MÉTODO PARA**  
**IDENTIFICAR UMA PATOGENIA EM PLANTAS**

PEDIDOS RELACIONADOS

5 Este pedido é uma continuação-em-parte de Pedido U.S.  
Nº 11/001.583, depositado em 1º de dezembro de 2004, que é  
uma continuação-em-parte do Pedido U.S. Nº 10/467.242,  
depositado em 16 de janeiro, 2004, que é o Pedido  
Internacional em fase Nacional PCT/US02/03606, depositado  
10 em 6 de fevereiro de 2002, publicado em inglês, que  
reivindica o benefício de Pedido Provisório U.S. Nº  
60/266.977, depositado em 7 de fevereiro de 2001.

Este pedido reivindica igualmente o benefício do  
Pedido Provisório U.S. Nº 60/741, 271, depositado em 30 de  
15 novembro de 2005.

Os ensinamentos inteiros dos Pedidos acima são  
incorporados neste por referência.

APOIO GOVERNAMENTAL

Esta invenção foi feita com fundos de Governo de  
20 contrato Nº F19628-00-C-0002 da Força Aérea dos E.U.A. O  
Governo tem determinados direitos sobre a invenção.

**FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO**

A necessidade de detectores pequenos, rápidos, e  
sensíveis de agentes biológicos que são capazes de  
25 monitorar um ambiente por períodos de tempo prolongados é  
revelada pela proliferação de armas biológicas e químicas,  
arma nuclear do frágil ser humano. Sob condições de campo  
de batalha, um detector útil alertaria rapidamente um  
soldado quando um agente biológico ou químico específico é

detectado de modo que as medidas defensivas pudessem rapidamente ser postas em prática.

Tais detectores poderiam ser igualmente úteis em aplicações não-militares. A detecção rápida de bactérias resistentes a antibióticos em um paciente poderia ajudar clínicos a selecionar um regime terapêutico mais eficaz. Monitoração contínua do abastecimento de água potável de uma cidade poderia prover o aviso prévio de patógenos potenciais, dando a oficiais das obras públicas mais tempo de controlar os riscos para a saúde potenciais ao público. Além disso, o uso destes detectores na inspeção das carnes e das carnes de aves seria uma melhoria significativa sobre o atual procedimento de "apalpar-e-cheirar". Geralmente, tais detectores são aplicações analíticas e diagnósticas bastante necessárias dentro dos campos da medicina (por exemplo, medicina veterinária), agricultura, proteção ambiental (por exemplo, para diagnosticar a síndrome do edifício doente), e o processamento ou o regulamentação de produtos alimentares.

Todos os animais vertebrados adquirem uma resposta imune específica a um agente externo (antígeno), em parte, gerando uma diversidade imensa de moléculas do anticorpo. As moléculas do anticorpo ligam-se ao antígeno com especificidade elevada, por exemplo, elas podem ligar-se de modo diferente a duas cepas intimamente relacionadas da bactéria, do vírus, da proteína, do ácido nucléico, do fungo, do protozoário, do parasita multicelular, ou do príon, assim como os produtos produzidos ou induzidos por aquelas partículas.

Os anticorpos são produzidos por células B, um componente crucial do sistema imunológico. Um antígeno pode ativar uma célula B ligando os anticorpos em sua superfície, conduzindo a uma cascata de reações bioquímicas intracelulares que resulta em um influxo de íon cálcio no citosol da célula B.

Para uma revisão da estrutura e da função do anticorpo e da ativação da célula B, vide Paul, editor, *Fundamental Immunology*, 3ª edição, Editora Raven, Nova Iorque (1993).

Os dispositivos que exploram a diversidade do anticorpo para a detecção de partículas ou antígenos alvo múltiplos e raros estão descritos em Patente U.S. N° 6.087.114 e em Patente U.S. N° 6.248.542.

Estes dispositivos incluem geralmente um meio líquido que contém células de sensor (por exemplo, uma célula B, um macrófago ou um fibroblasto), igualmente referido neste como células "CANARY" ou células "emissoras", um detector ótico, e o meio líquido que recebe as partículas alvo a ser detectadas. Cada uma das células possui receptores (por exemplo, anticorpos de cadeia quimérica ou única) que são expressos em sua superfície e são específicos para que o antígeno seja detectado. A ligação do antígeno ao receptor resulta numa série de reações (pathway) de sinalização que envolve as alterações químicas ou bioquímicas (por exemplo, um aumento na concentração do cálcio). As células também contêm moléculas de emissor (por exemplo, aequorin ou indo-1) em seu citosol que pode emitir fóton em resposta à série de reações de sinalização (por exemplo, concentração aumentada de cálcio no citosol). O

detector pode ser separado do meio que contém as células por uma cobertura (por exemplo, vidro) que seja transparente aos fótons. Tal cobertura pode servir para suportar o meio, proteger uma superfície frágil do detector, ou ser usada como uma lente. O detector ótico, por exemplo, um dispositivo de carga acoplada (CCD) é capaz de detectar os fótons emitidos das células em resposta à série de reações de sinalização de receptor-mediado e indicar ao usuário que o antígeno a ser detectado está presente. Outros detectores óticos que podem ser usados no dispositivo incluem os tubos fotomultiplicadores, os fotodiodos, dispositivos eletrônicos para gravar imagens (imagers) de semicondutor de óxido metálico complementar (CMOS), fotodiodos da avalanche, e dispositivos de carga acoplada de imagem intensificada (ICCD) (vide, por exemplo, aqueles disponíveis do Photek Ltd., East Sussex, Reino Unido). Em algumas modalidades, o detector ótico é capaz de distinguir células individuais.

#### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

São providos aqui os métodos para a detecção de partículas alvo. Em particular, os métodos são providos para a detecção de agentes biológicos, patógenos, bactérias, vírus, antígenos solúveis, toxinas, produtos químicos, explosivos, seqüências do ácido nucléico (por exemplo, DNA ou RNA), patógenos de planta, patógenos transportados pelo sangue, e semelhantes.

Os métodos para detecção de partículas alvo incluem a detecção de partículas alvo em amostras líquidas, em amostras de aerossol, e em amostras secas.

Igualmente é provida neste uma célula emissora que compreende um receptor, em que o receptor pode ser um anticorpo específico para um antígeno alvo, um anticorpo específico para um alvo geral (por exemplo, um rótulo tal como a biotina, ou uma imunoglobulina, e semelhantes). Além disso, o receptor pode ser um receptor Fc.

A célula emissora compreende adicionalmente uma molécula emissora para a detecção de uma partícula alvo em uma amostra em que a ligação do receptor à partícula alvo estimula uma resposta da molécula emissora. Em uma modalidade, o receptor estimula um aumento na concentração intracelular de cálcio, em que a molécula emissora emite um fóton em resposta ao aumento no cálcio intracelular. Em uma modalidade, a molécula emissora é um aequorin. Em uma outra modalidade, a molécula emissora é uma molécula de aequorin-GFP.

Igualmente é provido um dispositivo de sensor optoeletrônico para detectar uma partícula alvo em uma pluralidade de amostras usando um detector de fóton. Um dispositivo de sensor optoeletrônico pode detectar uma partícula alvo em uma amostra líquida. Alternativamente, um dispositivo de sensor optoeletrônico pode detectar uma partícula alvo em uma amostra de ar ou de aerossol. Em uma modalidade, o dispositivo de sensor compreende meios de centrifugação. Em uma outra modalidade, o dispositivo de sensor não compreende um meio de centrifugação. Em uma modalidade, o dispositivo de sensor compreende o pulverizador de aerossol. Em uma outra modalidade, o dispositivo de sensor compreende um meio de absorção de

material (wicking). Em uma modalidade adicional, o dispositivo de sensor compreende um substrato móvel. Em uma modalidade, o dispositivo de sensor compreende um substrato de pinhead para a captação de partículas alvo.

5 A detecção de uma partícula alvo (tal como um antígeno solúvel ou um ácido nucléico) é mediada em parte pela ligação da partícula alvo a um receptor, tanto diretamente quanto indiretamente, expresso na superfície da célula de uma célula emissora. A ligação direta pode ser via um  
10 receptor, tal como um anticorpo, que se liga diretamente e especificamente à partícula alvo. A ligação indireta da partícula alvo pode ser através de um receptor Fc que se ligue a um anticorpo que esteja sendo unido (limite) à partícula alvo.

#### 15 **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

A patente ou pedido de depósito contém pelo menos um desenho executado em cores. As cópias desta publicação de pedido de patente com desenhos coloridos serão providas pelo Escritório sob solicitação e pagamento da taxa  
20 necessária.

A FIGURA 1 é um diagrama esquemático do conceito celular de sensor optoeletrônico.

A FIGURA 2 é um diagrama esquemático que mostra a arquitetura geral de um sensor optoeletrônico que possui  
25 uma amostra (trigger) para a percepção preliminar dos agentes suspeitos.

A FIGURA3 é um diagrama esquemático que ilustra a criação das linhagens celulares para uso no sensor optoeletrônico.

A FIGURA 4 é um diagrama esquemático de um sensor de alerta de aerossol biológico integrado (BAWS) /sistema de sensor optoeletrônico.

5 A FIGURA 5 ilustra a resposta da célula B ao vírus da doença da febre aftosa no sensor optoeletrônico.

A FIGURA 6 ilustra um módulo do projétil seco para o sensor optoeletrônico.

A FIGURA 7 é um diagrama esquemático que ilustra o efeito da localização e da mistura.

10 A FIGURA 8 ilustra o efeito da localização usando células de tularemia.

A FIGURA 9 ilustra um módulo automatizado da entrega de célula para o sensor optoeletrônico.

15 A FIGURA 10 ilustra uma dose resposta relacionada a uma amostra de células de tularemia usando o sensor optoeletrônico.

A FIGURA 11 ilustra a resistência de célula B às contaminações química e biológica.

20 A FIGURA 12 ilustra um módulo automatizado de centrifugação para o sensor optoeletrônico.

A FIGURA 13 é um diagrama esquemático que ilustra um projétil de ar/sensor optoeletrônico.

A FIGURA 14 é um diagrama esquemático que ilustra um sensor optoeletrônico.

25 A FIGURA 15 ilustra um módulo ótico-fotomultiplicador (PMT) para o sensor optoeletrônico.

A FIGURA 16 é um diagrama esquemático que ilustra um projétil de ar/sensor optoeletrônico.

A FIGURA 17 é um diagrama esquemático que ilustra uma centrífuga de multicanal no sensor optoeletrônico.

A FIGURA 18 é um diagrama esquemático que ilustra um conceito de centrífuga/projétil úmido no sensor optoeletrônico.

A FIGURA 19 é um diagrama esquemático que ilustra um conceito de centrífuga/projétil úmido no sensor optoeletrônico.

A FIGURA 20 é um diagrama esquemático de um tubo feito sob medida para o sensor optoeletrônico.

A FIGURA 21 ilustra um projétil seco /sensor optoeletrônico integrado.

A FIGURA 22 ilustra o efeito de tratamentos da célula em resposta a células B específicas de Pestis Yersinia (Peste Negra).

A FIGURA 23 ilustra um projétil configurado para coletar amostras do aerossol.

A FIGURA 24 é uma vista geral esquemática do conceito fundamentado no sensor "CANARY". As células B foram modificadas de modo que elas expressassem aequorin no interior da célula e nos anticorpos para patógeno na superfície da célula. Na presença do patógeno, os anticorpos sofrem uma "reticulação" (imobilizado, agregado) na superfície da célula, estimulando uma cascata da sinalização que resulta no cálcio intracelular aumentado. Aequorin responde a este aumento no cálcio intracelular por oxidação de aequorin e emissão de luz. A saída de fóton pode ser monitorada usando um PMT.

A FIGURA 25 é um diagrama esquemático de detecção de DNA. Os Oligonucleotídeos complementares para seqüências de DNA alvo e contendo um rótulo de digoxigenina terminal são hibridizados para o DNA alvo. Os múltiplos oligonucleotídeos de digoxigenina-rotulados se ligam ao longo da reticulação do DNA alvo aos anticorpos de digoxigenina na superfície da célula de CANARY (célula emissora), estimulando a emissão de luz.

As FIGURAS. 26A-C são gráficos. As células de CANARY (células emissoras) que expressam anticorpos contra a digoxigenina podem ser estimuladas pelo DNA de digoxigenina rotulada. As células emissoras que expressam o anticorpo contra a digoxigenina foram adicionadas aos tubos de centrifugação que contêm 50  $\mu$ l da concentração indicada de padrões de DNA de digoxigenina rotulada. O tubo foi centrifugado momentaneamente para peletizar as células no fundo do tubo, o mais próximo de PMT, e para a emissão de fótons como uma função de tempo gravado. Três tipos diferentes de DNA de digoxigenina rotulada foram usados para estimular as células e cada um foi bem-sucedido com um grau diferente de sensibilidade. A FIGURA 26A mostra o DNA plasmídeo rotulado densamente com digoxigenina (aproximadamente 4000 pares base com as 200 moléculas de digoxigenina unidas) foi detectado com um limite de detecção de aproximadamente 1 ng/ml (50 pg absoluto).

A FIGURA 26B mostra os padrões de peso molecular do DNA de vários tamanhos (81-8576 pares base) rotulados de forma esparsa com digoxigenina (sendo por 200 pares base) que foram detectados em 1  $\mu$ g/ml (50 ng absoluto).

A FIGURA 26C mostra os padrões de peso molecular do DNA de vários tamanhos (8-587 pares base) cada um rotulado com 2 digoxigeninas (um digoxigenina em cada extremidade da molécula do DNA) que foram detectados em 100 ng/ml (5 ng absoluto).

As FIGURAS 27A-B são gráficos. A centrifugação das células pode diminuir a sensibilidade ao antígeno solúvel. As células emissoras que expressam o anticorpo contra a digoxigenina foram adicionadas aos tubos de centrifugação que contêm 50 µl da concentração indicada de DNA plasmídeo de digoxigenina rotulada.

A FIGURA 27A mostra os tubos que foram centrifugados momentaneamente para peletizar as células no fundo do tubo, o mais próximo de PMT, e para a emissão de fótons como uma função de tempo gravado.

A FIGURA 27B mostra que as células e o DNA foram misturados manualmente e foram colocados sobre o PMT sem centrifugação.

A FIGURA 28 é um gráfico. Dois oligonucleotídeos rotulados como DIG complementares (Oligo "3" e Oligo "NEG 3") foram reservados para serem hibridizados sob circunstâncias experimentais. A amostra foi diluída 1:10 com meio CO2I a um volume total de 100µl, 20µl de células foram adicionados, e a emissão de luz foi medida. As células DIG expressam o anticorpo DIG, enquanto as células de controle não o fazem.

A FIGURA 29 é um gráfico. A hibridização rápida de Digoxigenina rotulada, oligonucleotídeos ssDNA. A quantidade indicada de oligonucleotídeo "NEG3" foi

adicionada a 8µl da solução de hibridização (50mM de NaCl, 40mM Tris pH 7.5). 1µl de "oligo 3"; foi adicionado, seguido imediatamente por 90µl de meio CO2I e por 20µl de células de CANARY Dig. O tubo foi agitado para misturar, colocado rapidamente no luminômetro e a saída de luz foi monitorada. O tempo total entre a adição do segundo oligonucleotídeo e a colocação no luminômetro ("0" no eixo x) foi de aproximadamente 15 segundos.

A FIGURA 30 é um gráfico. O DNA de cadeia simples foi gerado a partir de fago (phagemid) de pBluescript, e hibridizado para todos os 10 oligonucleotídeos Dig rotulados. Após a hibridização da reação foram diluídos 100µl em CO2I, 20µl de células Dig foram adicionados, e a emissão de luz foi medida. A razão molar indicada na legenda é aquela do oligonucleotídeo para o ssDNA alvo. A razão ideal neste experimento parece estar entre 1:2 e 1:4.

A FIGURA 31 é um gráfico que mostra a detecção de Sequência específica do DNA de cadeia simples. Dez sondas de oligonucleotídeo de digoxigenina rotulada complementares para a (+) cadeia de fago de pBluescript foram hibridizadas para a quantidade indicada de DNA fago de cadeia simples. As células emissoras que expressam o anticorpo a digoxigenina foram adicionadas, e a saída de luz das células monitoradas em um tubo fotomultiplicador. Somente (+) cadeia de fago foi detectada, indicando que a identificação é uma seqüência específica. Na ausência de ponta de sonda de oligonucleotídeo, o DNA de cadeia simples não estimulou as células. O limite de detecção neste experimento foi de 50 ng.

As FIGURAS. 32A-B são gráficos de barra. Efeitos da temperatura da hibridização na detecção do ácido nucléico. O DNA fago de cadeia simples foi hibridizado para as concentrações indicadas de sonda em diversas temperaturas, e o RLU máximo plotado.

A FIGURA 32A ilustra a hibridização em PBS que mostra um sinal máximo com hibridização em 51°C, mas sinais similares das amostras hibridizadas em 47°C e 42°C.

A FIGURA 32B ilustra que a hibridização em 42°C exhibe um aumento no sinal dos experimentos usando baixas concentrações de sonda de oligonucleotídeo, tal que 0.16pmol do oligonucleotídeo funcione quase como 0.63pmol, e o sinal de 0.04pmol foi dobrado.

A FIGURA 33 é um diagrama esquemático da estratégia para a sedimentação de DNA. Os oligonucleotídeos captados são unidos à superfície de uma partícula sedimentável. Estes oligonucleotídeos ligam-se a uma região separada daquela a que os oligonucleotídeos Dig se ligam. NA alvo liga-se aos oligonucleotídeos de captação, e oligonucleotídeos de digoxigenina rotulada ligam-se ao alvo. O complexo inteiro é sedimentado pela centrifugação (ou campo magnético), e detectado pelas células emissoras que expressam o anticorpo contra a Digoxigenina.

A FIGURA 34 é um gráfico. A Sedimentação do DNA alvo melhora a sensibilidade. As microesferas (beads) de Estreptavidina conjugada foram saturados com biotina de oligonucleotídeo de captação rotulado e o excesso de oligonucleotídeo foi removido por lavagem. O ssDNA do pBluescript (+ cadeia) foi incubado com as microesferas por

5 minutos a 47°C e lavado. Os oligonucleotídeos rotulados de detecção Dig foram adicionados, hibridizados por 20 minutos a 47°C, e o excesso removido por lavagem. As microesferas foram ressuspensas em 200 µl de CO2I, e 40 µl usado em cada ensaio.

A FIGURA 35 é um diagrama de barra. O ssDNA do fago do pBS foi incubado com limite de oligonucleotídeo de biotina rotulada às microesferas de poliestireno de estreptavidina revestida e oligonucleotídeos de digoxigenina rotulada por 20 minutos a 47°C nas concentrações indicadas de reagente de bloqueio. O limite da microesfera alvo rotulado de digoxigenina foi lavado 3 vezes em TBS (50 mM Tris, 130 mM NaCl) na temperatura ambiente. As microesferas foram ressuspensas no meio CO2I, as células emisoras adicionadas, e a reação agitada em movimento circular e saída de luz monitorada por um luminômetro.

As FIGURAS.36A-C são gráficos. A FIGURA 36A mostra as células de U937 exibindo um aumento na equação Fcγ RI quando tratadas com o IFNγ. A equação relativa de FcγRI nas células U937 tratadas com o IFNγ (200 ng/ml, pico verde aberto) ou não tratadas (pico roxo sólido) foi medida pela imunofluorescência.

A FIGURA 36B mostra as células U937 que expressam a proteína funcional de aequorin. As células U937 transferidas com a proteína aequorin luminescente sensível a cálcio emitem luz quando tratadas com o ionomicina (50 M).

A FIGURA 36 C mostra que a luz é detectada após o ligação cruzada dos receptores Fc nas células U937 com

expressão estável de aequorin. As células U937 foram pré-incubadas com 10µg/ml de IgG humano, a seguir foram lavadas e tratadas com o IgG anti-humano de cabra (Fab2').

5 As FIGURAS. 37A-D são gráficos. As células U937 podem ser projetadas rapidamente para responder a diversos patógenos ou simulações diferentes. As células U937 foram tratadas durante 24 horas com IFN $\gamma$  (200ng/ml) para aumentar a equação de endógeno Fc $\gamma$ RI, e preparadas para o ensaio de CANARY. As células foram incubadas então com os seguintes  
10 anticorpos: A FIGURA 37 A mostra espora *anthracis* do camundongo anti-B, a FIGURA 37B mostra o espora *anthracis* do coelho anti-B policlonal, a FIGURA 37C mostra um camundongo anti-F. *tularensis*, ou a FIGURA 37D mostra um camundongo anti-B sobrenadante de hybridoma *subtilis*. As  
15 células foram usadas então no ensaio de CANARY padrão onde elas foram detectadas com pelo menos 1000cfu de espora de *B. anthracis* com o anticorpo monoclonal e 10.00 cfu dos esporos de coelho policlonal, assim como esporos de 10.000 cfu de *F. tularensis* e 1.000cfu de *B. subtilis*.

20 As FIGURAS. 38A-C são gráficos. As células U937 que foram rapidamente projetadas são específicas, e a especificidade é determinada pelo anticorpo. A FIGURA 38A mostra as células de U937 incubadas com os anticorpos de camundongo anti-F. *tularensis* que não responderam a esporos  
25 *B anthracis* de 10<sup>5</sup>cfu, mas fizeram 10<sup>6</sup>cfu de *F. tularensis*. A FIGURA 38B mostra as células carregadas com anticorpos de esporos anti-*B anthracis* de camundongo que não responderam ao *F. tularensis*, mas fizeram 10<sup>6</sup> cfu dos esporos *B. anthracis*. A FIGURA 38C ilustra as células que não

mostraram nenhuma resposta ao *F. tularensis* de  $10^6$ cfu na ausência do anticorpo anti-*F. tularensis* [ $10^6$ cfu F.t. (nenhum ausência)].

A FIGURA 39 é uma ilustração de um sensor de 16  
5 canais. Um sensor foi projetado para que permitisse a  
medição simultânea de 16 amostras usando um único canal de  
recolhimento de luz. O sensor consiste em um rotor que  
prende dezesseis tubos de 1.5ml horizontalmente,  
distribuídos igualmente sobre sua circunferência, e  
10 acionado por um motor de velocidade variável sobre um eixo  
vertical. Um único elemento de detecção de fóton fixo (por  
exemplo, um PMT) é posicionado no plano do rotor apenas  
além do percurso dos tubos durante a rotação. Desta  
maneira, cada um dos tubos é trazido seqüencialmente e  
15 repetitivamente para bem próximo ao PMT, permitindo que sua  
saída de luz seja amostrada em cada passagem. Finalmente,  
um interruptor ótico que consiste em uma fonte ótica (um  
LED infravermelho) e um detector (um fototransistor) são  
usados para controlar a contagem de fótons detectados e da  
20 reorganização dos dados em 16 campos, cada um associado com  
uma amostra específica.

FIGURA 40 é um gráfico. Os dados do sensor de 16  
canais demonstram um LOD idêntico àquele obtido em um  
instrumento de único canal, salvo que 16 amostras são  
25 medidas simultaneamente. Uma única medida consiste nas  
seguintes etapas: preparar 16 amostras (e/ou controles) nos  
tubos individuais de 1.5ml, introduzindo um percentual das  
células emissoras em cada um dos tubos, instalando os tubos  
dentro do rotor situado em um caixa preta, colocando as

células emissoras no fundo dos tubos usando em um curto intervalo de tempo (5 segundos) uma centrífuga giratória em RCF elevado (~2000 g), reduzindo a velocidade do rotor a 60 RPM para a duração da medição (cada tubo que está sendo amostrado uma vez a cada segundo), e gerando uma série cronológica de acúmulos de fóton para cada amostra para expor e/ou entrar em um computador algoritimos para a avaliação.

A FIGURA 41 é uma ilustração de um projeto do sensor portátil de 16 canais.

A FIGURA 42 é uma ilustração de uma entrega de célula emissora e coleta de aerossol integrado de Dica CANARY.

A FIGURA 43 é uma ilustração de uma representação do módulo de coleta de aerossol com bico de colisão e tubo transparente.

A FIGURA 44 é uma ilustração de um módulo de entrega de célula emissora com sistema de entrega de válvula.

A FIGURA 45 é uma vista geral de um sensor de 16 canais e resulta no uso dos mesmos.

A FIGURA 46 é uma vista geral da detecção de toxinas.

A FIGURA 47 é uma vista geral de uma célula de sensor que expressa o aequorin e um receptor generalizado do anticorpo.

A FIGURA 48 é um diagrama esquemático para a detecção de antígenos solúveis, monoméricos: estratégia 1. Uma única célula emissora é projetada para expressar dois anticorpos diferentes contra dois epítomos diferentes no mesmo, antígeno monomérico. A presença de antígeno realiza a

ligação cruzada dos anticorpos, estimulando a célula emissora para emitir a luz.

A FIGURA 49 é um gráfico que apresenta os resultados de uma linhagem celular que expressa anticorpos contra tanto a *B. anthracis* quanto aos *Y. Pestis* que foi administrada com cada *B. anthracis* e *Y. pestis*. Esta linhagem celular clonal pode detectar não menos que 50cfu tanto de *B. anthracis* quanto de *Y. pestis*, indicando que ambos locais de ligação de antígeno de ambos os anticorpos são expressos e funcionais.

A FIGURA 50 é diagrama esquemático da estratégia para a detecção de proteínas solúveis. Um antígeno composto de dois ou mais epítomos é detectado usando dois anticorpos, um limite às microesferas (ou alguma sustentação que ligue aos anticorpos múltiplos) e o segundo anticorpo é expresso pela célula emissora. O antígeno é incubado com a microesfera de anticorpo coberto, adornando sua superfície com antígenos múltiplos. A microesfera é apresentada a eles pela célula emissora. Pelo motivo do antígeno sofrer ligação cruzada através da microesfera, os anticorpos da célula emissora sofrem ligação cruzada e a emissão de luz é estimulada.

A FIGURA 51 é um gráfico que apresenta os resultados do anticorpo 6E 10-10, que sofre ligação cruzada junto às microesferas magnéticas de proteína G, que foi incubado com uma quantidade de variações de BoNT/A Hc por 3 horas a 4°C. As microesferas foram lavados com meio de CO<sub>2</sub>I três vezes. As células emissoras que expressam o anticorpo 6B2-2 foram adicionadas, a reação foi agitada em círculos por 5

segundos, e a saída de luz foi monitorada em um luminômetro.

A FIGURA 52 é um diagrama esquemático da detecção de um produto químico. Um peptídeo é isolado para que se ligue especificamente ao produto químico de interesse, e um anticorpo é gerado para que se ligue especificamente ao complexo de peptídeo do produto químico. Caso o peptídeo do produto químico forme um epítipo funcional simples, um epítipo adicional pode ser incorporado dentro do peptídeo. Como mostrado, este epítipo é uma molécula de digoxigenina, mas qualquer o epítipo específico seria suficiente. Na presença do produto químico, o complexo de peptídeo de produto químico compreenderia dois locais de ligação de anticorpo, e poderia ser detectado de uma maneira similar como toxinas da proteína.

A FIGURA 53 é um diagrama esquemático que apresenta um método alternativo para detectar um produto químico. Dois peptídeos são isolados para que se liguem ao tandem para o produto químico de interesse. A ligação destes peptídeos poderia ser detectada pela geração de anticorpos contra cada complexo do peptídeo do produto químico, ou identificando os peptídeos com os locais de ligação do anticorpo como mostrado.

A FIGURA 54 é um diagrama esquemático de um outro método alternativo para detectar um produto químico. Um peptídeo que se liga a dois produtos químicos de interesse é preparado para que forme um complexo de dímero de peptídeo de produto químico. Um anticorpo é preparado para que se ligue especificamente ao complexo de dímero doe

peptídeo do produto. Um anticorpo é preparado para que se ligue especificamente complexo de dímero de peptídeo de produto químico. O complexo de dímero de peptídeo de produto químico pode conter dois locais de ligação de anticorpo suficientes para estimular células emissoras a aumentar o cálcio intracelular, desse modo resultando em emissão de fóton pela molécula emissora.

A FIGURA 55 é um gráfico. Digoxigenina de oligonucleotídeos rotulados que foi adicionada ao RNA no tampão de hibridização (40 mM Tris, 130 mM NaCl, 10 mM DTT, RNasin Plus) e incubado por 2 minutos em 47°C. O meio de CO2I e as células foram adicionados, o tubo foi agitado em círculos por 5 segundos, e a saída de luz foi monitorada em um PMT. O limite de detecção neste ensaio foi de 20ng. A falta da resposta ao RNA controlador (oposto à cadeia) indica que o ensaio é uma seqüência específica.

A FIGURA 56 é um diagrama esquemático. Os antígenos, incluindo toxinas, podem ser compreendidos de 2 ou mais epítomos. Uma célula de CANARY expressa tipicamente um único anticorpo contra o epítomo alvo. No pior caso, o cenário do antígeno pode estar presente na forma monomérica. Enquanto o anticorpo na célula de CANARY for capaz de se ligar ao antígeno monomérico, os anticorpos não sofreram ligação cruzada e nenhuma luz é emitida.

A FIGURA 57 é um diagrama esquemático. Detecção da toxina solúvel que simula CANARY. O anticorpo monoclonal contra um epítomo na proteína de BoNT/A Hc (6E10-10) foi produzido a partir dos hibridomas, e conjugado à proteína-G revestida de microesferas magnéticos. Em adição a estes

microesferas para solução que contém BoNT/A, se revestirá as microesferas com as cópias múltiplas de antígeno imobilizado, que podem estimular as células de CANARY que expressam anticorpo contra um epítopo não-sobreposto (nonoverlapping).

A FIGURA 58 é um gráfico. As microesferas A-revestidas de proteína foram conjugados ao anticorpo de 6E10-10, e estas microesferas foram adicionadas a BoNT/A Hc diluídos no meio de CO2I. O tubo foi posto em rotação por 2 minutos, as células de CANARY que expressam o anticorpo 6B2-2 foram adicionadas, e a mistura girou em círculos por 5 segundos. A saída de luz foi monitorada usando um PMT.

A FIGURA 59 é um diagrama de barra. Efeito de armazenamento congelado na solubilidade e na antigenicidade de BoNT Hc. 400ng/ml de BoNT Hc foram usados para administrar o ensaio de CANARY baseado em microesfera. O antígeno fresco dá uma resposta 35 vezes sobre fundo. Os agentes congelado e descongelado dão a resposta ligeiramente reduzida, e centrifugando este material congelado-descongelado diminui-se significativamente a resposta, indicando a geração de agregados durante o processo congelamento-descongelamento. Um segundo lote de BoNT Hc proveniente da mesma companhia que mostra menos reatividade, indicando uma variação significativa lote-a-lote no antígeno.

A FIGURA 60 é um gráfico. A detecção de BoNT/A Hc em Produtos do Sangue. A CANARY é capaz de detectar BoNT/A solúvel Hc em produtos do sangue. BoNT/A Hc (400 ng/ml \*\*) dopado (spiked) em CO2I e incubado com as microesferas por

12 minutos, produz um sinal forte. Todo o sangue introduzido com BoNT/A Hc, antes da remoção do material celular, é detectado igualmente por CANARY. BoNT/A Hc introduzido no plasma após a remoção das células sanguíneas (preparados como descritos em outra parte) igualmente produz uma resposta significativa estatisticamente. \*\* Observe que estes ensaios de BoNT/A Hc congelado e descongelado testados, assim que a sensibilidade aparente apresentada é afetada adversamente pela perda de antígeno agregado durante o armazenamento.

A FIGURA 61 é um gráfico. A detecção de BoNT/A Hc em urina. Nenhuma preparação da amostra foi exigida para a detecção de BoNT/A em amostras de urina. As microesferas foram adicionadas diretamente à urina dopada com 400 ng/ml \*\* BoNT/A Hc, incubada por 12 minutos, e as microesferas removidas magneticamente. Os meios foram adicionados às microesferas, seguidos por células de CANARY, e a amostra foi agitada em círculos por 5 segundos. Duas das três amostras de urina dopada mostram o sinal significativo, enquanto o sinal proveniente da terceira amostra for baixo. Urina controlada, que não foi dopada com BoNT/A Hc antes da adição da microesfera, não dá sinal, indicando que os estimuladores não específicos não estão presentes. \*\* Observe que estes ensaios usaram BoNT/A Hc congelado e descongelado, assim que a sensibilidade aparente apresentada é afetada adversamente pela perda de antígeno agregado perdido durante o armazenamento.

A FIGURA 62 é um diagrama esquemático. Um procedimento alternado da preparação da amostra é usado para as amostras

derivadas dos chumaços (swabs) nasais. A preparação da amostra exige o próprio chumaço, um cesto (basket) que contém um filtro de 5 microns integral, e o tubo de ensaio. O chumaço é coletado, a haste do chumaço é posta para fora, e a cabeça do chumaço é colocada no cesto do filtro. O meio de CO2I é adicionado ao chumaço, e ao conjunto tampado e centrifugado. As microesferas são adicionadas ao filtrado e ao ensaio realizado sem modificação adicional.

A FIGURA 63 é um gráfico. Os chumaços nasais foram coletados como descrito, colocados no cesto do filtro, e meios CO2I dopados com BoNT/A Hc em 400 ng/ml \*\* foram adicionados. A amostra foi filtrada, as microesferas adicionadas, e foram analisadas. A resposta contra a estas amostras dopadas foram similares às respostas contra os chumaços de controle, em que nenhum "material" nasal estivesse presente, indicando que as secreções nasais preparadas desse modo não contém inibidores. Chumaços nasais a que somente CO2I foi adicionado mostraram nenhuma resposta, indicando que os chumaços nasais não contém qualquer estimulador não específico do ensaio. \*\* Observe que estes ensaios testaram BoNT/A Hc congelado e descongelado, assim que a sensibilidade aparente apresentada é afetada adversamente pela perda de antígeno agregado durante o armazenamento.

A FIGURA 64 é um diagrama de barra. A detecção da toxina em líquidos diferentes. BoNT/A Hc foi introduzido em cada solução às concentrações indicadas. Para 10µl dessa solução foram adicionados 1.4µl da solução que contém 560 mM NaCl, 1,4 M Hepes pH 7,9, e as microesferas 6E10-10

paramagnéticos conjugados. A amostra foi agitada em círculos por 12 minutos, 190µl do meio de ensaio adicionado, e as microesferas capturadas magneticamente (30 segundos). O material não limitado foi descartado, e as 5 microesferas perfaziam 50µl do meio de ensaio. 20µl de células de CANARY que expressam o anticorpo contra o epítopo 6B2-2 foram adicionados, o tubo foi girado em círculos por 5 segundos, e colocado em um luminômetro. Os magnitudes são da saída de pico de luz (fótons/segundo) 10 dividida pela saída luz de células de CANARY no meio sem antígeno (barra vermelha, 0 ng/ml). O procedimento de lavagem remove os estimuladores não específicos, como indicado pelas respostas similares das células às microesferas incubadas em matrizes diferentes sem adição do 15 antígeno. O ensaio de CANARY detecta o antígeno introduzido no sumo de laranja (barra verde) e no PBT/triton (barra azul claro) assim como na solução de controle (meio de ensaio) (barra vermelha), com um LOD de 80 ng/ml. A sensibilidade no leite (barra azul escuro) é inibida por 20 mais do que 5 vezes.

A FIGURA 65 é um gráfico. O ensaio de CANARY detecta a neurotoxina botulinum de Tipo A. O meio do A. CO2I foi dopado com as concentrações indicadas de toxina botulinum. As microesferas 6E10-10 foram adicionadas e incubadas por 2 25 minutos. As células de CANARY que expressam o anticorpo 6B2-2 foram adicionadas, a mistura foi girada por 5 segundos, e a saída luz monitorada. As amostras que contêm 160pg de toxina (16 ng/ml) estimularam as células para mais do que 10 vezes sobre fundo. As amostras que contêm 32pg da

toxina (3.2 ng/ml) estimula células a mais do que 3 vezes sobre fundo.

A FIGURA 66 é um gráfico. O meio CO2I foi dopado com as concentrações indicadas de toxina botulinum. As 5 microesferas da proteína G conjugadas ao anticorpo S25 foram adicionadas e incubadas por 2 minutos. As células de CANARY que expressam o anticorpo Raz foram adicionadas, a mistura foi girada por 5 segundos, e a saída de luz monitorada.

10 A FIGURA 67 é um gráfico. Todo o sangue foi dopado à concentração indicada de BoNT/A. As células sanguíneas foram removidas por centrifugação, e as microesferas magnéticas de anticorpo revestido 6E' 10-10 foram 15 adicionadas a 10µl de plasma resultante. A amostra foi girada por 2 minutos, 190ml do meio adicionados, e o tubo colocado em uma cremalheira magnética por 20 segundos. Os meios e o plasma foram aspirados, o tubo foi removido do ímã, e 50µl de meio CO2I foi adicionado. As células de 20 CANARY foram colocadas no tampo do tubo e a amostra foi girada por 5 segundos para iniciar o contato da célula de microesfera, o tubo foi colocado no luminômetro e a saída de luz foi monitorada.

A FIGURA 68 é um gráfico. As microesferas de 25 Estreptavidina revestidos foram limitados ao anticorpo de 6E10-10 que tiverem sido biotinilados com biotina de sulfo-NHS, biotina de sulfo- NHS- LC- ou biotina de sulfo-NHS-LC-LC. As microesferas foram adicionadas à solução que contém 800 ng/ml BoNT/A Hc, e incubadas por 2 minutos. As células de CANARY 6B2-2 foram adicionadas, o tubo foi girado por 5

segundos, e a saída de luz monitorada. A biotina unida pelo pêndulo mais longo do espaçador (LCLC) dando um sinal ligeiramente melhor.

A FIGURA 69 é um gráfico. O anticorpo 6E10-10 Biotinilado que liga-se às microesferas revestidas de estreptavidina foi adicionado às concentrações indicadas de BoNT/A e girado por 15 minutos à temperatura ambiente. As células de CANARY 6B2-2 foram adicionadas, o tubo foi girado por 5 segundos, e a saída de luz monitorada em um PMT.

A FIGURA 70 é um gráfico. Estreptavidina de microesferas magnéticos revestidos foi limitada a uma mistura do anticorpo 6C2-4 e 6E10-10 biotinilado. As microesferas foram adicionadas às concentrações indicadas de BoNT/A e giradas por 15 minutos à temperatura ambiente. As células de CANARY 6B2-2 foram adicionadas, o tubo foi girado por 5 segundos, e a saída de luz monitorada em um PMT.

A FIGURA 71 é um gráfico. As microesferas foram diluídas 10 vezes provenientes da concentração padrão. 100 microlitros de 0.32 ng/ml de BoNT/A em CO2I na concentração indicada foram adicionados, e o tubo foi rodado durante a noite à temperatura ambiente. As células de CANARY 6B2-2 foram adicionadas, o tubo foi girado por 5 segundos, e a saída de luz monitorada em um PMT.

A FIGURA 72 é um diagrama esquemático.

A FIGURA 73 é uma série de gráficos que demonstram as células U937 pode ser preparado para detectar diversos patógenos diferentes.

A FIGURA 74 é um par de gráficos que demonstram que as células aequorin U937 carregadas tanto com o anticorpo monoclonal como com o anticorpo policlonal podem detectar o esporo de *B. anthracis*

5 A FIGURA 75 é um sumário da linhagem celular receptora/universal Fc.

A FIGURA 76 é um sumário de um protocolo experimental para células para preparação/carregamento U937.

10 A FIGURA 77 é um sumário do protocolo para um ensaio da célula receptora Fc.

A FIGURA 78 é um sumário de modalidades alternativas.

A FIGURA 79 é um sumário de modalidades alternativas.

15 A FIGURA 80 é uma série de gráficos e de um diagrama de barra que demonstram um deslocamento na emissão de luz para aequorin com EGFP.

A FIGURA 81 é uma série de gráficos de análise de FACS que demonstram a detecção de fluorescência EGFP de moléculas emissoras aequorin-GFP.

20 A FIGURA 82 é um par de gráficos que demonstram a detecção do deslocamento do comprimento de onda do aequorin-EGFP pelo espectrofotômetro.

A FIGURA 83 é um gráfico que demonstra a função de clones de M12g3R EGFP-aequorin similarmente às células únicas de aequorin M12g3R.

25 A FIGURA 84 é uma série de gráficos que demonstram a detecção do esporo pelo aequorin U937 e pelas células de U937 EGFP-aequorin.

A FIGURA 85 é uma série de gráficos que demonstram a fluorescência de células de CANARY estimuladas.

A FIGURA 86 é um diagrama esquemático da detecção de sinal multiplexado.

A FIGURA 87 é um diagrama esquemático das células de CANARY que têm cores de emissão diferentes.

5 A FIGURA 88 é um diagrama esquemático de uma estratégia de clonagem para EGFP-aequorin.

A FIGURA 89 é um diagrama esquemático da produção de células de CANARY patógeno-específico.

10 A FIGURA 90 é um diagrama esquemático de células de CANARY universais.

A FIGURA 91 é um esboço dos exemplos das modalidades da invenção.

A FIGURA 92 é um diagrama esquemático para produzir células de CANARY universais.

15 A FIGURA 93 é um diagrama esquemático da produção de uma linhagem celular macrofágica universal.

A FIGURA 94 é um diagrama esquemático da sinalização do receptor Fc e da produção de uma célula de sensor universal.

20 A FIGURA 95 é um diagrama esquemático de uma linhagem celular universal anti-Ig (antiimunoglobulina).

A FIGURA 96 é um diagrama esquemático de comparação.

A FIGURA 97 é um sumário do diagrama esquemático de células de CANARY universais.

25 A FIGURA 98 é um esboço de células de receptor Fc universal.

A FIGURA 99 é um esboço de modalidades da detecção de toxina.

A FIGURA 100 é um gráfico que demonstra a detecção do *Ralstonia solanacearum* no extrato de gerânio como descrita neste.

5 A FIGURA 101 é uma série de fotografias que ilustram o tecido de gerânio sendo processado para a detecção do patógeno.

A FIGURA 102 é um gráfico que demonstra a detecção do potivírus BYMV usando o método da união da microesfera como descrito neste.

10 A FIGURA 103 é uma série de fotografias que ilustram uma modalidade do aparelho para a detecção dos patógenos carregados pelo sangue em uma amostra de sangue e um gráfico que demonstra os resultados da detecção do patógeno.

15 A FIGURA 104 é um diagrama esquemático que ilustra componentes da invenção descrita neste.

A FIGURA 105 é um gráfico que demonstra a detecção do patógeno em uma amostra de sangue.

20 A FIGURA 106 é um gráfico. Padrão Ba com entrega da célula 20 $\mu$ l. 50 $\mu$ l das amostras Ba preparadas no meio CO<sub>2</sub> (I) e testadas com células B 20 $\mu$ l. Os resultados indicam o fundo baixo e um LOD de 50 cfu Ba (n=2).

25 A FIGURA. 107 é um gráfico. Pulverizador da célula B Ba. 50 $\mu$ l de amostras Ba foram preparados em meio CO<sub>2</sub> (I) e testados com número de variação de pulverizadores de célula B. Os resultados indicam o fundo aumentado com os 2 pulverizadores comparados à entrega da célula 20 $\mu$ l. O número de pulverizadores não afetou a intensidade máxima com os 50.000 cfu Ba (n=1).

A FIGURA. 108 é um gráfico. Os padrões Ba com 1 - pulverizador de entrega de célula. 50ul de amostras Ba foram preparados em meio CO2 (I) e testados com um pulverizador de células B. Os resultados indicam fundos similares com a entrega da célula 20ul e o LOD de 5.000cfu. 50 e 500cfu Ba mostraram a possibilidade de 50% da detecção (n=2).

A FIGURA. 109 é um gráfico. Padrão Ba: detecção de Ba 500cfu com 20ul de células B. 50ul de amostras Ba com 500cfu Ba foi preparado em meio CO2 (I) e testado com 20ul de células B. Detecção de 100% dos resultados de 500cfu mesmo com fundo mais alto do que visto normalmente (n=3).

A FIGURA 110 é um gráfico. Pulverizador da célula B Ba: detecção de Ba 500cfu Ba com 1 - pulverizador de célula B. 50ul de amostras Ba com os 500cfu Ba foi preparado em meio CO2 (I) e testado com 1 pulverizador de células B. Os resultados indicam a detecção de 50% de 500cfu e de um fundo 2-3x mais alto (n=14).

FIGURA 111 é um gráfico. Pulverizador da célula B Ba: detecção de Ba 500cfu com 1 - pulverizador de células B e nenhum enrolamento. 50ul de amostras Ba com Ba 500cfu foram preparados em meio CO2 (I) e testado com 1 pulverizador de células B. As amostras não foram giradas por 5 segundos antes de ler. Os resultados não indicam célula à interação do agente tendo por resultado a detecção de 0% 500cfu Ba (n=3).

A FIGURA. 112 é um gráfico. Pulverizador da célula B YP: detecção de 500cfu Yp com 20ul de células B. 50ul de

amostras YP com o 500cfu Yp foi preparado em meio CO<sub>2</sub> (I) e testado com 20ul de células B. Os resultados indicam um fundo e 100% da detecção de 500cfu Yp (n=4).

5 A FIGURA. 113 é um gráfico. Pulverizador da célula B YP: detecção 500cfu Yp com 1 - pulverizador de células B. 50ul de amostras YP com YP 500cfu foi preparado em meio CO<sub>2</sub> (I) e testado com 1 pulverizador de células B. Os resultados indicam um fundo ligeiramente aumentado com a  
10 detecção de 100% de YP 500cfu (n=8).

A FIGURA 114 é um gráfico. Padrão YP: detecção de Ba 500cfu com 20ul de células B. 50ul de amostras Yp com 500cfu Yp foi preparado em meio CO<sub>2</sub> (i) e testado com células B de 20ul. Detecção de 100% dos resultados de  
15 500cfu com um fundo típico (n=7).

A FIGURA. 115 é um gráfico. Pulverizador da célula B YP: 500cfu da detecção de YP seco com células B de 20ul. 5ul de amostras Yp com 500cfu de Yp foram preparados em dH<sub>2</sub>O , seco durante a noite, e testado com células B DE  
20 20ul. Os resultados indicam a detecção de 100% de YP de 500cfu (n=10).

A FIGURA. 116 é um gráfico. Pulverizador da célula B YP: 500cfu da detecção de YP seco com 1 - pulverizador de células B. 5ul de amostras Yp com YP de 500cfu foram  
25 preparados em dH<sub>2</sub>O, seco durante a noite, e testado com 1 - pulverizador de células B. Os resultados indicam um fundo mais alto, mas a detecção de 100% de 500cfu de Yp (n=10).

A FIGURA. 117 é uma representação esquemática de um experimento de colisão de célula B.

A FIGURA. 118 é uma representação esquemática de um aparelho de aspiração.

A FIGURA. 119 é uma representação esquemática da aspiração baseada no princípio Bernoulli.

5 A FIGURA. 120 é uma representação esquemática de uma modalidade da invenção.

A FIGURA. 121 é um par de fotografias que ilustram um sensor de 16 canais portáteis da presente invenção. O sensor consiste em um rotor que contém tubos de ensaio na posição horizontal, distribuídos igualmente sobre sua circunferência, e conduzido por um motor de velocidade variável sobre um eixo vertical. Um único elemento de detecção de fóton fixo, neste caso um PMT, é posicionado no plano do rotor muito além do percurso dos tubos durante a rotação. Desta maneira, cada um dos tubos se mostra seqüencialmente e repetidamente bem próximos ao PMT, permitindo que sua saída de luz seja amostrada em cada passagem. Finalmente, um interruptor ótico que consiste em uma fonte ótica (um LED infravermelho) e um detector (um fototransistor) são usados para controlar a contagem de fótons detectados e a reorganização dos dados em 16 campos, cada um associado com uma amostra específica.

25 A FIGURA. 122 é um diagrama esquemático de possíveis métodos para coletar o antígeno suspeito na superfície de amostra: (a) colisão de ar; (b) coleta eletrostática; (c) coleta eletroforética de uma amostra líquida; (d) coleta de 2 partes de uma amostra líquida: incubação com as microesferas magnéticas funcionalizadas que capturam o

antígeno; captação das microesferas por atração no campo magnético não-uniforme do pino (pin) magnetizado (neste caso, usando uma ponta afiada, mais exatamente a 'cabeça', pode ser desejável, porque a força nas microesferas magnéticas é relacionada às não-uniformidades no campo magnético).

FIGURAS 123 (a) - (c) são diagramas esquemáticos: FIGURA 123 (a) é um 'pino reto'; com as partículas coletadas na cabeça; FIGURA 123 (b) reticulação do tubo de amostra com meio e células-B CANARY estabelecidas; FIG. 123 (c) é um pino invertido no tubo de B-célula, iniciando a resposta luminosa.

A FIGURA. 124 é um gráfico de curvas da dose resposta de substrato de pinhead para os esporos BS secos em cima de substratos de pinhead e introduzidos (em segundos 0) em um tubo de 200 $\mu$ l que contém 50 $\mu$ l de células sensíveis a Bs estabelecidas (por centrifugação). As concentrações da preparação do esporo BS são mostradas na legenda. A resposta a um pino preparado com 107/ml de YP é mostrada como um controle negativo e uma indicação de uma falta da reatividade cruzada.

A FIGURA. 125 é um gráfico de resposta de célula B BS aos esporos eletrostaticamente coletados BS. Um potencial de 5.5Kv foi colocado através do pino oposto (como na FIGURA 122 (b)). As concentrações de esporos BS que variam de 100-370 ACPLA (agente que contém partículas por litro do ar) foram fluidizadas em pasta pelos pinos em uma taxa de 2l/min para variação de períodos de tempo. Uma correlação

aproximada entre o tempo da coleta e a resposta da célula B foi observada.

A FIGURA. 126 é um gráfico. Modalidade de "substrato de pinhead" magnético. As partículas do bacillus-subtilis foram secas em cima da cabeça de um pino (simulando a colisão de ar ou o produto de algum outro método de coleta localizada apropriado) e colocadas a seguir em um líquido contendo células B rotuladas magneticamente. O pino foi magnetizado para atrair células B aos esporos secos e colocado em um luminômetro.

FIGURA 127 (a)-(b) são gráficos de uma Comparação entre o padrão, ensaio de CANARY centrífugo e ensaio de microesfera magnética dupla. A FIGURA 127(a) mostra Y. Pestis em um ensaio de CANARY padrão e a FIGURA 127(b) mostra Y. Pestis em um ensaio de microesfera magnética dupla. As microesferas magnéticas específicas para Y. pestis foram misturadas com uma série de diluições de agente Y. pestis por 5 minutos. Após os 5 minutos as microesferas magnéticas foram puxadas para o fundo do tubo de ensaio junto com qualquer limite Y. pestis, e o sobrenadante foi removido. As células B rotuladas magnéticas a seguir foram adicionadas à amostra e puxadas em direção ao fundo do tubo.

A FIGURA 128 é um diagrama esquemático. O princípio de captação da amostra em um formato de corrente lateral. A amostra é adicionada ao enchimento (pad) da amostra (200µl), que por sua vez satura o enchimento e flui em direção à membrana da captação (membrana de 0.2µm). As células B (50µl) são adicionadas então ao enchimento de

amostra e lentamente conduzidas por materiais absorventes (wick) em direção à membrana de captação onde encontram o antígeno capturado e emitem fótons.

5 A FIGURA 129 é uma fotografia de um formato de ensaio de corrente lateral portátil. Uma amostra de microesferas coloridas (1µm de diâmetro) foi colocada em cima do enchimento da amostra e permitiu a condução por canais (wicked up) até a membrana de captação demonstrar a zona de captação do agente. O tamanho total é 1 in. × 0.25 in.

10 A FIGURA 130 é uma série de gráficos que demonstram os resultados do ensaio de corrente lateral: (a) E. Coli em um ensaio de CANARY padrão, (b) E. Coli de ensaio de corrente lateral que mostra um LOD de 5000 partículas por amostra de 200ml, (c) B. anthracis em um ensaio de CANARY padrão, e (d)  
15 B. anthracis em um ensaio de corrente lateral que mostra um LOD de 5000 partículas por a amostra de 200ml.

A FIGURA 131 é um diagrama esquemático das modalidades de um sensor bioaerossol CANARY automatizado.

20 A FIGURA 132 é um par de fotografias que ilustram um disca CANARY integrado da presente invenção. O disco de sensor bioaerossol CANARY automatizado realiza a coleta do aerossol e armazenamento da célula B CANARY e funções de entrega. Para a comparação do tamanho, um disco compacto (CD) é mostrado.

25 A FIGURA 133 é uma série de fotografias que ilustram a coleta de detalhes do disco de sensor bioaerossol CANARY automatizado.

A FIGURA 134 é uma série de ilustrações que demonstram a otimização da coleta de aerossol do disco de sensor

bioaerossol CANARY automatizado. Uma pluralidade de geometrias do projétil foi projetada e testada usando-se CFD (Dinâmica Fluida Computacional) a modelagem e o desempenho foram verificados de modo experimental pela  
5 coleta de esferas fluorescentes sob forma de aerossol de 1µm de poliestireno como as partículas modelo. Todas as geometrias testadas demonstraram a coleta e as geometrias funcionais mais simples que foram identificadas e usadas em um desenvolvimento adicional. Outras geometrias testadas  
10 mostraram as propriedades úteis que incluem a focalização e a redirecionamento da partícula que podem ser úteis no desenvolvimento das geometrias do projétil novo capazes de produzir densidades de partícula mais altas relativas a geometrias padrão.

15 A FIGURA 135 é uma série de fotografias da entrega de célula de disco de sensor bioaerossol CANARY automatizada - Modalidade Tampa Viscosa. Nesta modalidade, uma câmara é formada com volume suficiente para conter células B CANARY para um ensaio simples em uma configuração que possa ser  
20 selada no plano do disco por uma tampa feita com uma alta viscosidade, uma lubrificação ou um gel compatível a célula (por exemplo, lubrificação de silicone, ou uma geléia de petróleo). A geometria das paredes onde as tampas viscosas são inseridas no disco está projetada para confinar a tampa  
25 e mantê-la estável durante o transporte e a manipulação, mas liberar a tampa quando a força centrífuga suficiente é aplicada durante um breve enrolamento de modo que as células sejam liberadas para se moverem automaticamente para o local da análise. O gel pode ser selecionado para

ser mais ou menos denso do que o meio aquoso que contém as células B CANARY. Caso sua densidade seja maior do que esta do meio celular B (por exemplo, lubrificação de silicone) a tampa viscosa se estabelecerá no fundo do líquido em uma região definida do disco longe do local da análise CANARY. Caso a densidade do gel seja menos do que esta do meio celular B (por exemplo, lubrificação de silicone) a tampa viscosa se estabelecerá na parte superior do reagente CANARY e poderá ser usado para formar a um selo acima do local da reação para estabilizá-lo para o armazenamento e o transporte a um laboratório para um teste confirmativo adicional.

A FIGURA 136 é um diagrama esquemático que ilustra a entrega de célula de sensor bioaerossol CANARY automatizado - Modalidade de Blister de Rompível. Este em armazenamenta CANARY da célula B da modalidade os compartimentos para cada local da análise são construídos na tampa do disco usando materiais e métodos de empacotamento tradicionais. A forma e a espessura das bolhas serão projetadas para permitir a pressão localizada aplicada à parte superior do disco para romper o lado das bolhas que enfrentam os locais do ensaio para permitir as células B da CANARY de ser entregue ao local do ensaio com uma breve rotação. O disco conterá características para suportar uniformemente a bolha nos lados longe do local da reação e para focalizar a força aplicada em uma área específica para prever a entrega líquida reprodutível. O cartão da bolha que incorpora os blisters terá aberturas como mostrado para prever a relação apropriada com o ar de direção múltipla corra através do

disco para a coleta do aerossol, e o cartão inteiro serão selados ao disco para fornecer a separação entre cada um dos canais individuais da análise.

A FIGURA. 136 é um diagrama esquemático que ilustra entrega de célula do sensor bioaerossol CANARY automatizada - Modalidade de Blister de Rompível. Nesta modalidade os compartimentos de armazenamento de célula B CANARY para cada local da análise são construídos no tampo (lid) do disco usando materiais e métodos de empacotamento de blisters tradicionais. A forma e a espessura dos blisters serão projetadas para permitir a pressão localizada aplicada à parte superior do disco para romper o lado dos blisters que enfrentam os locais do ensaio para permitir que as células B CANARY sejam entregues ao local do ensaio com um breve enrolamento. O disco conterà características para suportar uniformemente o blister nos lados distantes do local da reação e para focalizar a força aplicada em uma área específica para prover a entrega líquida reprodutível. O cartão de blister que incorpora os blisters terá aberturas como mostrado para prover à interface apropriada com a corrente de ar direcionada múltiplas vezes através do disco para a coleta de aerossol, e o cartão inteiro serão selados ao disco para prover a separação entre cada um dos canais individuais de análise.

A FIGURA. 137 é um gráfico. Resultados de colisão de Esporo de Bacillus Subtilis do disco PANTHER. As partículas de Bacillus subtilis (agente 200 que contém partículas por litro do ar, ou ACPLA) colidiram em um disco de teste para um minuto, usando uma câmara de aerossol e um nebulizador

de Colisão. Os canais de teste subseqüentes foram  
sujeitados às células B tanto específicas (gráfico) quanto  
não-reativas (linhagem celular *Yersinia pestis*) para  
*Bacillus subtilis*. Nenhum sinal foi observado em linhagem  
5 não-reativa (*Yersinia pestis*).

A FIGURA. 138 é um sumário da tecnologia CANARY.

A FIGURA. 139 é um sumário de linhagens celulares  
patógeno-detectado.

A FIGURA. 140 é um sumário de células de CANARY  
10 universais para detectar doenças emergentes.

A FIGURA. 141 é um diagrama esquemático de um ensaio  
de CANARY para amostras líquidas e secas.

A FIGURA. 142 é um exemplo de um ensaio de CANARY de  
uma amostra líquida.

15 A FIGURA. 143 é um diagrama esquemático de detecção de  
toxina usando a tecnologia CANARY descrita neste.

A FIGURA. 144 é um exemplo de detecção CANARY de  
toxina *Botulinum* usando a captação de microesfera como  
descrita neste.

20 A FIGURA. 145 é um sumário de um ensaio de CANARY para  
os patógenos carregados por sangue.

A FIGURA. 146 é um sumário de um estudo de *Chlamydia*  
usando a tecnologia CANARY.

A FIGURA. 147 é um sumário da tecnologia CANARY  
25 aplicado aos patógenos agrícolas.

A FIGURA. 148 é um exemplo de detecção CANARY de  
patógenos de planta.

A FIGURA. 149 é um par de fotografias de um sensor  
CANARY de 16 canais portáteis.

A FIGURA. 150 é uma ilustração de um bancada de provas (testbed) CANARY de Bioaerossol automatizado (BCAN).

A FIGURA. 151 é uma ilustração de analisador de patógeno para evitar liberações ambientais (PANTHER).

5 A FIGURA. 152 é uma ilustração de um desenvolvimento de disco da PANTHER integrado.

A FIGURA. 153 é um sumário da tecnologia CANARY.

A FIGURA. 154 é um sumário de detecção CANARY da toxina Botulinum.

10 A FIGURA. 155 é um sumário do desempenho do sensor bioaerossol CANARY.

A FIGURA. 156 é um sumário da extração do vírus do tecido de planta.

As FIGURAS 157A e B ilustram a detecção do vírus de planta usanda CANARY. A FIGURA 157A ilustra a preparação da amostra.

A FIGURA 157B representa graficamente os resultados.

20 A FIGURA. 158 é gráficos dos resultados da detecção de BoNT/A na urina. Nenhuma preparação da amostra foi requerida para a detecção de BoNT/A em amostras de urina. As microesferas conjugadas ao anticorpo 6E10-10 foram adicionados diretamente à urina dopada com o BoNT/A ativo, incubado por 15 minutos, e as microesferas lavadas. Os meios foram adicionados às microesferas, seguidos por  
25 células de CANARY, e a amostra girou por 5 segundos. O limite de detecção era 16 ng/ml, aproximadamente 5 vezes mais alto do que BoNT/A diluída diretamente no meio do ensaio. Urina de controle (control urine) (0 ng/ml), que não foi dopada com BoNT/A Hc antes da adição da

microesfera, não dá nenhum sinal, indicando que todos os estimuladores não específicos foram removidos.

A FIGURA. 159 é gráficos dos resultados da detecção de BoNT/A Hc no sangue. A CANARY é capaz de detectar BoNT/A solúvel Hc em produtos do sangue. BoNT/A foi dopado no sangue inteiro e no plasma preparado como descrito em outra parte (vide seção Fran na preparação da amostra de sangue). As microesferas de Proteína G revestidas por anticorpo 6E10-10 foram adicionadas ao plasma, incubadas por 2 minutos, lavadas dentro do meio e analisadas usando as células 6B2-2. O limite de detecção para BoNT/A neste ensaio foi de 16 ng/ml.

A FIGURA. 160 é gráficos dos resultados dos efeitos de adicionar NaCl, Tween-20, e Triton X-100 ao plasma. A adição de NaCl (concentração final de 0.5M) produziu a melhoria mais substancial na amplitude do sinal, 1700 RLU a 4800 RLU. A adição de Tween era ineficaz, mas a adição de Triton melhorou o sinal de forma periférica a 2700 RLU. Combinar o sal com o detergente melhorou o sinal comparado ao detergente sozinho, mas não em níveis acima daqueles conseguidos com o sal sozinho.

A FIGURA. 161 é gráficos dos resultados de BoNT/A (5 fmoles = 800pg) e BoNT/A complexo (5 fmoles = 5 ng) incubado por 20 minutos com o anticorpo 6E10-10 limitado pelas microesferas de estreptavidina. As células 6B2-2 foram adicionadas e a saída de luz foi monitorada. Respostas similares vindas do ensaio de CANARY das quantidades equimolares de ambas as preparações indicam que

as proteínas complexas não afetam o anticorpo que liga a BoNT/A.

A FIGURA. 162 é gráficos dos resultados da detecção de BoNT/A no meio do controle. As microesferas magnéticas revestidas com o anticorpo de 6E10-10 foram adicionadas aos meios dopados com as concentrações indicadas de BoNT/A. A amostra foi rodada por 2 minutos para permitir à toxina se ligar às microesferas. As células de CANARY 6B2-2 foram adicionadas, a mistura foi girada por 5 segundos e a emissão de luz monitorada. As amostras que contêm 160pg de BoNT/A (16 ng/ml) de sinais produzidos 6 vezes sobre fundo

A FIGURA 163 é um diagrama de barra. As quantidades iguais de vários materiais radiológicos que cobrem todos os três tipos do emissor (alfa, beta, e gama) foram analisadas. A resposta de CANARY é comparada favoravelmente a um instrumento comercial com base laboratorial.

A FIGURA 164 é um diagrama esquemático de detecção química por células de CANARY. Conceitualmente, a detecção dos produtos químicos, tais como agentes de guerra biológica (guerra biológica), por CANARY é muito similar à detecção de toxinas da proteína. As proteínas de ligação periplasmáticas (PBPs) são unidas à superfície de uma microesfera. A presença do produto químico alvo converte o PBP de uma forma que seja reconhecido por anticorpos na superfície da célula de CANARY, estimulando desse modo a emissão de luz.

A FIGURA 165 é um gráfico. Os pontos de dados representam a eficiência média medida a partir de 6 rotações de colisão com as esferas polidispersas de látex

poliestireno que sofreu aerossol com o gerador Pitt. Um medidor de partícula simples dos APS foi comutado entre a entrada e a saída do projétil. A linha vermelha cheia é um ajuste exponencial aos dados calculados a média entre 0,7 e 1,5µm. Acima de 2µm, os números de resultados calculados transformam-se menos confiáveis devido ao resultado de aerossolização mais baixa (e conseqüentemente contagens de partícula baixa) para estas partículas maiores no gerador Pitt.

10 AS FIGURAS. 166A e B ilustram o método e os resultados da identificação seca dos esporos do *Bacillus subtilis*. Como mostrado no diagrama esquemático do protocolo de ensaio seco (A FIGURA 166A), as células B específicas para *B. subtilis* são adicionadas e breve centrifugação conduz as 15 células para o local de coleta situado no fundo do tubo de amostra. As demonstrações da especificidade no ensaio seco formatam (A FIGURA 166B): Curva azul: *B. subtilis* colidido dentro dos tubos de amostra e detectado com células contra *B. subtilis* demonstra a habilidade de CANARY de detectar 20 amostras colididas. Controles negativos: respostas da linha base foram observadas para a exposição de células *B. subtilis* a *V. cholerae* secos (curva Cinza), contaminadores de ar colididos em um tubo vazio na ausência de patógeno (curva Vermelha), e quando as células contra *Yersinia pestis* foram expostas a esporos de *B. subtilis* de colisão a 25 seco (curva Preta).

A FIGURA 167 ilustra o carreador de BCAN para coleta de bioaerossol automatizada e a análise CANARY.

A FIGURA 168 ilustra um disco CANARY (CD) projetado para integrar a coleta de aerossol e a entrega da célula B.

A FIGURA 169 ilustra a representação do módulo de coleta de aerossol com bico de colisão e o tubo transparente.

A FIGURA 170 ilustra um módulo- CANARY de entrega de célula B com sistema de entrega de válvula.

A FIGURA 171 ilustra um biossensor automatizado TCAN-2 com a tampa opaca removida.

A FIGURA 172 ilustra uma modalidade da invenção. O disco PANTHER (deixado) é a ferramenta de análise CANARY e uma amostra de bioaerossol independentes que pode ser carregada como um CD dentro do sensor CUB PANTHER portátil (centro) ou finalmente dentro de um sensor de identificação e detecção de ponto automatizado de resultado máximo.

As FIGURAS 173A e B são diagramas esquemáticos de uma modalidade da invenção como descrito neste.

A FIGURA 174 é um diagrama esquemático adicional de uma modalidade da invenção.

A FIGURA 175 é um diagrama de barra que ilustra a razão entre a taxa de corrente e o tamanho das partículas que são transportadas eficazmente através do disco e direcionadas para impactar na superfície da coleta do dispositivo descrito neste.

A FIGURA 176 ilustra uma modalidade da invenção.

A FIGURA 177 ilustra um equipamento de sensor compacto que processa automaticamente os discos CANARY ilustrados.

A FIGURA 178 ilustra os componentes do núcleo de um dispositivo CANARY descrito neste.

A FIGURA 179 é um gráfico das características de desempenho do sensor do CUB. Sinais típicos provenientes da análise do CUB de aerossóis de esporo de *Bacillus subtilis*.

5 A FIGURA 180 ilustra modalidades diferentes da invenção.

A FIGURA 181 é uma ilustração esquemática de conceitos positivos e negativos de dieletroforese.

A FIGURA 182 é um processo de fabricação para chips de teste de DEP.

10 As FIGURAS 183A e B ilustram (a) projeto básico de chip de DEP, consistindo nos eletrodos de película fina de tungstênio interdigitado em um substrato de quartzo, (b) uma tabela de combinações de comprimento de linhas e espaçamentos.

15 A FIGURA 184 é um diagrama esquemático do princípio de captação da amostra no formato de corrente lateral. A amostra é adicionada ao enchimento da amostra (~200µl), que por sua vez satura o enchimento e flui em direção à membrana de captação (membrana de 0.2µm). As células B  
20 (50µl) são adicionadas então ao enchimento de amostra e lentamente ao material absorvente em direção à membrana da captação onde eles encontram o antígeno capturado e emitem fótons.

25 A FIGURA 185 é uma fotografia de um formato de ensaio de corrente lateral portátil. Uma amostra de microesferas coloridas (1µm de diâmetro) foi colocada na almofada de amostra e material absorvente até ser permitido que a membrana de captação demonstre a zona de captação do agente. O tamanho total é 1 polegada x 0.25 polegada.

As FIGURAS. 186A-D são gráficos de resultados de ensaio de corrente lateral: A FIGURA 186A: E. Coli em um ensaio de CANARY padrão, FIGURA 186B: ensaio de corrente lateral de E. Coli que mostra um LOD de 5000 partículas por amostra de 200 ml, FIGURA 186C: B. Anthracis em um ensaio de CANARY padrão, e FIGURA 186D: B. anthracis em um ensaio de corrente lateral que mostra um LOD de 5000 partículas por amostra de 200ml.

As FIGURAS. 187A e B são gráficos de uma comparação entre o padrão, ensaio de CANARY centrífugo e ensaio de microesfera magnética dupla. (a) Y. pestis em um ensaio de CANARY padrão e (b) Y. pestis em um ensaio de microesfera magnética dupla. As microesferas magnéticas específicas para Y. pestis foram misturadas com uma série de diluições de agente de Y. pestis por 5 Minutos. Após 5 minutos as microesferas magnéticas foram puxadas para o fundo do tubo de ensaio junto com todos os limites de Y. pestis, e o sobrenadante foi removido. As células B magneticamente rotuladas então foram adicionadas à amostra e puxadas para baixo para o fundo do tubo.

A FIGURA 188 é um diagrama esquemático de um cartucho de sensor portátil, (a) cartucho com o chumaço magnético na posição armazenada, (b) chumaço retirado do cartucho, (c) chumaço de modo operacional, com: 1 - aperto, 2 - luva protetora (retirada), 3 - eixo, 4 - ponta magnética. (d) Chumaço pronto para a inserção à posição lida, (e) cartucho com o chumaço na posição lida: 5 - a cápsula da B-célula girou no lugar para receber a ponta magnética, 6 - emissão do fóton através do furo na parte inferior do cartucho.

A FIGURA. 188 é um diagrama esquemático de um cartucho de sensor portátil, (a) cartucho com chumaço magnético na posição armazenada, (b) chumaço retirado a partir do cartucho, (c) chumaço pronto para uso, com: 1 - alicate, 2  
5 - luva protetora (retirada), 3 - eixo, 4 - ponta magnética. (d) Chumaço pronto para a inserção para posição lida, (e) cartucho com chumaço na posição lida: 5 - cápsula de célula B rodou dentro do lugar para receber a ponta magnética, 6 - emissão de fóton através do furo no fundo do cartucho.

10 A FIGURA 189 é um par de diagramas esquemáticos de um projeto de sensor CANARY portátil. Este projeto reorienta o PMT de modo que se direcione diretamente no fundo do tubo de ensaio, onde a coleta de células de CANARY para a coleta máxima de sinal. O mecanismo de inserção da amostra foi  
15 projetado para operar via um mecanismo deslizante que permitisse a operação fácil, distância mínima entre a amostra e o PMT, e da proteção do PMT a partir da luz ambiental durante a etapa da carga de amostra para minimizar o ruído do instrumento durante a saída de  
20 impulsos magnéticos (readout). A maçaneta da porta estava projetada para incorporar um ímã forte de terra rara para a manipulação de amostra, e um receptor de tubo para prender o tubo em posição perto do ímã enquanto estas manipulações forem realizadas.

25 A FIGURA. 190 é uma série de fotografias de um protótipo de sensor CANARY portátil. O PMT tem um catodo bialcalino com uma taxa de sensibilidade espectral eficaz de 300-650 nm. É operado na modalidade de coidentificador de fóton e os sinais são gravados e podem ser transferidos

para um laptop via um RS-232, tampa de 9 pinos para uma análise adicional. A unidade portátil tem a opção de ficar em rotação por até 8 horas usando as baterias NiCd recarregáveis construídas dentro do sensor ou ficar em rotação indefinidamente quando unida a uma fonte de potência 12-V (igualmente usada para recarregar o pacote de bateria interno)

### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

A invenção descrita neste provê métodos para detectar antígenos solúveis. Por exemplo, o antígeno solúvel pode ser uma proteína solúvel ou um produto químico. Em uma modalidade, os antígenos solúveis compreendem somente um ou dois epítomos antigênicos. A detecção de antígenos solúveis usando um anticorpo expresso na superfície de uma célula, por meio do qual a ligação do anticorpo ao antígeno provoca um aumento na concentração de cálcio que estimula por sua vez uma molécula emissora para se emitir um fóton em resposta ao aumento no cálcio intracelular dependendo da habilidade do antígeno para reticular (ou agregado, imobilizando, desse modo, o anticorpo na superfície da célula) os anticorpos na superfície da célula, estimulando desse modo um aumento no cálcio intracelular. Um antígeno solúvel pode ser incapaz em reticular os anticorpos expressos na superfície de uma célula, e é conseqüentemente incapaz em estimular um aumento no cálcio intracelular. São descritos neste os métodos para detectar um antígeno solúvel, em que a reticulação dos anticorpos é conseguida pelos métodos descritos, que estimulam um aumento no cálcio intracelular e causam a emissão de um fóton a partir de uma

molécula emissora que responda ao aumento na concentração de cálcio.

Os antígenos e os produtos químicos solúveis de interesse a serem detectados incluem uma grande variedade de agentes. Por exemplo, e sem limitação, os métodos da invenção descrita aqui podem ser usados para detectar toxinas de proteína tais como toxinas Botulinum, serótipos A, B, C, D, E, F, G, enterotoxina-B de estafilococos (SEB) e os outros superantígenos, ricina, toxina da coqueluche, toxina de Shiga, conotoxinas, toxinas do épsilon de perfríngenos de Clostridium, Shiga semelhante a ribossomo que desativa proteínas, outros produtos bacterianos solúveis, tais como o antígeno F1 de *Y. pestis*, antígeno protetor, fator letal, fator de edema de *B. anthracis*.

Outras moléculas de interesse na detecção incluem o quorum bacteriano sensível a moléculas, por exemplo, lactona de homoserina. Exemplos de agentes de guerra química, ou seus produtos de decomposição depois que a hidrólise puder ser detectada usando os métodos descritos neste inclui, sem limitação, cianido (ácido Hidrociânico), fosfogênio (dicloreto carbônico), CK (cloreto de cianogênio), CL (Cloro), CX (dicloreto de Carbonimídico, hidróxi), DP (ácido de Carbonoclorídico, éster do triclorometil), GA, Tabun (ácido Dimetilfosforamidocianídico, éster etílico), GB, ácido de sarin 9 Metilfosfonofluorídico, (1 - metiletil) éster), GD, Soman (ácido Metilfosfonofluorídico, éster 1,2,2-trimetilpropila), GF (Ácido Metilfosfonofluorídico, éster de cicloexila), mostarda (1,1' - Tiobis [2 - cloroetano]), HN-I, mostarda de

nitrogênio (2-Cloro-N- (2-cloroetil)-N-etiletanamina), HN-2, mostarda de nitrogênio (2-Cloro-N- (2-cloroetil)-N-metiletanamina), Lewsite ((2-Cloroetenila) dicloreto arsonous), PFIB (1,1,3,3,3-pentaflúor-2-trifluormetil-1-propeno), Trifosgênio (ácido carbônico, éster triclorometila), V-gás (ácido Metilfosfonotiólico, S-[2 (dietilamino) etil] O-2-metilpropil éster), VX (ácido Metilfosfonotiólico, S- [2 [bis (1- metiletil) amino] etil] O-etil éster)), componentes binários de VX ( O-2diisopropilaminoetil metilfosfonito e Enxofre), componentes binários de GD (Metilfosfonil difloreto (DF) e uma mistura do álcool pinacolila e de uma amina, componentes binários de GB (Metilfosfonil difloreto (DF) e uma mistura (OPA) de álcool isopropila e de amina isopropila. Adicionalmente, outros produtos químicos produzidos biologicamente podem igualmente ser detectados pelos métodos da presente invenção, incluindo Micotoxinas, particularmente tricoteceno micotoxinas (T2), grupo Diverso de Diacetoxiscirpenol, Saxitoxina, ou os outros produtos do dinoflagelado, Microcistinas (vários tipos), Palitoxina, Satratoxina H, aflatoxinas, e Tetrodotoxina.

As proteínas adicionais de interesse para serem detectadas incluem, APP (Amilóide Precursor de Proteínas) príon proteínas associadas com o CJD, BSE, Scrapie, Kuru, e PSA (antígeno específico de próstata). Além disso, a detecção de antígenos ou de produtos químicos solúveis apropriados é útil em uma variedade de aplicações, tais como aplicações clínicas, por exemplo, função de tiróide, função adrenal, metabolismo do osso, fertilidade,

infertilidade, deficiência de IVF, na gravidez, no  
crescimento e no hormônio do crescimento, diabetes,  
hematologia, função cardíaca, câncer, alergia, doenças  
auto-imunes, monitoramento terapêutico da droga, drogas de  
5 abuso, pesquisa de aplicações de imunoensaio, proteínas  
geneticamente projetadas, resíduo da droga do leite, função  
de fígado, administração de antibióticos e de síntese de  
antibióticos. Os antígenos solúveis apropriados para a  
análise nestas aplicações são conhecidos por aqueles da  
10 versados na técnica (vide, por exemplo, O manual de  
Imunoensaio" (The Immunoassay Handbook") (segunda edição),  
David Wild, ed. Nature Publishing Group 2001. NY NY).

A presente invenção também provê a detecção e a  
identificação de seqüências específicas de ácido nucléico  
15 (NA). Em uma modalidade, os antígenos são unidos ao NA alvo  
usando sondas de oligonucleotídeo. Estas sondas envolvem  
seqüências específicas do NA com antígenos. Este antígeno  
envolvido (igualmente referido neste como antígeno-  
conjugado) oligonucleotídeo é capaz de estimular as células  
20 emissoras que expressam anticorpo contra esse antígeno.  
Sonda livre, caso presente, é monomérica, e  
conseqüentemente não estimula células emissoras. Do mesmo  
modo, a ligação de fundo do oligonucleotídeo rotulado para  
locais não específicos no NA não estimulará  
25 significativamente as células emissoras, porque os  
antígenos que resultam destes eventos de ligação de fundo  
raro serão muito dispersos para realizar reticulação  
eficazmente em anticorpos.

A escolha do antígeno depende de muitos fatores, incluindo a disponibilidade e as características de anticorpos correspondentes, a ausência de antígenos de reagentes cruzados nas amostras a serem testadas, e a solubilidade, a estabilidade, e o custo do conjugado de antígeno-oligonucleotídeo, como será compreendido por um versado na técnica. Como usado aqui, um oligonucleotídeo pode ser DNA, RNA, o ácido nucléico peptídico (PNA), ácidos nucléicos fechados, ou qualquer variedade de ácido nucléico substitutos modificados que se especializaram e de características originais como é conhecido na técnica. Adicionalmente, a adição de aminoácidos catiônicos (no peptídeo ou na forma de proteína) a tais sondas pode aumentar as taxas de hibridização. Caso desejado, aqueles peptídeos/proteínas catiônicos poderiam servir de dupla função como o antígeno detectado pela célula emissora. Conseqüentemente, em uma modalidade da invenção, um sistema de detecção de Baseado nas células emissoras que têm um ou mais anticorpos em sua superfície e que compreendem um composto (uma molécula emissora) que emite um fóton através da estimulação por antígenos que são multiméricos devido à presença de NA alvo, em particular, emissão de fóton é estimulada por um aumento na concentração intracelular do cálcio.

Igualmente provido na invenção aqui descrita é uma célula de sensor que detecta uma partícula alvo que está ligada por um ou mais anticorpos. Especificamente, células de sensor compreendem uma molécula emissora e um receptor Fc que se liga a um anticorpo que seja ligado ao agente ou

à partícula alvo. Em uma modalidade, a célula de sensor que compreende um receptor Fc é uma célula do macrofágica, tal como a linhagem celular humana U937 do macrófago. Outras células ou linhagens celulares apropriadas serão conhecidas para aqueles versados na técnica. Os receptores Fc são uma família de proteínas de membranas expressas que se ligam aos anticorpos ou aos complexos imunes. São expressos em diversas células hematopoiéticas que incluem monócitos e macrófagos. Diversas subclasses de receptores Fc existem incluindo Receptor gama Fc I (Fc $\gamma$ RI), um ligante de alta afinidade de anticorpo solúvel. Fc $\gamma$ I se liga à região constante (porção Fc) de imunoglobulina G (IgG) que sai da região de ligação de antígeno do anticorpo livre. A reticulação do receptor Fc ligado a anticorpo inicia por antígeno específico uma reação de sinalização que estimula a liberação de cálcio. Conseqüentemente, a reticulação do receptor Fc na célula de sensor resulta em um aumento na concentração intracelular de cálcio e a molécula emissora emite, desse modo, um fóton em resposta ao aumento na concentração do cálcio.

Igualmente é provido na invenção descrita aqui um Sensor de 16 Canais. Em sua forma mais simples, um ensaio de célula emissora consiste em preparar uma amostra em um tubo transparente, introduzindo uma porcentagem de células emissoras especialmente preparadas dentro do tubo, conduzindo as células emissoras ao fundo do tubo usando um enrolamento centrífugo rápido e medindo a saída de luz do tubo com um sensor de contagem de fóton. No laboratório, a maioria dos ensaios da célula emissora são feitos

seqüencialmente, uma amostra de cada vez; no instrumento BAWs/CANARY automatizado, quatro amostras são medidas simultaneamente, cada amostra que tem seu próprio canal de recolhimento de luz. O sistema anterior requer mais tempo, enquanto o último requer um hardware mais complexo (e mais onerosa).

Uma abordagem diferente que reduza o momento de medir amostras múltiplas (ao manter as exigências mínimas de hardware) é descrita neste. Um sensor foi projetado a fim de permitir a medição simultânea de uma pluralidade de amostras usando um único canal de recolhimento de luz. O sensor consiste em um rotor que retém dezesseis tubos de 1.5ml horizontalmente, distribuídos igualmente sobre sua circunferência, e conduzido por um motor de velocidade variável sobre um eixo vertical (FIG. 39). Um único elemento de detecção de fóton fixo (por exemplo, um PMT) é posicionado no plano do rotor um pouco além do percurso dos tubos durante a rotação. Neste projeto, cada um dos tubos é trazido seqüencialmente e repetitivamente à grande proximidade do elemento de detecção de fóton, permitindo que sua saída de luz seja amostrada em cada passagem. Finalmente, um interruptor ótico que consiste em uma fonte ótica (um LED infravermelho) e um detector (um fototransistor) são usados para controlar a contagem de fótons detectados e da reorganização dos dados dentro dos 16 campos, cada um associado com uma amostra específica.

Uma implementação adicional deste projeto de 16 canais é referida como um sensor de TCAN. O biossensor TCAN (CANARY-desencadeado) é um biossensor automatizado que

combina tanto a coleta de aerossol quanto a entrega líquida da célula emissora em um formato de disco radial integrado. O disco CANARY TCAN (CD) (FIG. 42) realiza interface com um conjunto multiforme que divide um fluxo de ar em canais separados. O conjunto de coleta de aerossol (FIG. 43) usa técnicas de colisão seca para localizar então partículas do fluxo de ar no fundo dos tubos plásticos desobstruídos.

Após a colisão de partículas de aerossol, as interfaces de CD com o conjunto multiforme atuam em válvulas localizadas no disco. O disco é girado rapidamente, que por sua vez faz com que o líquido de célula emissora seja entregue aos tubos individuais usando a força centrífuga (FIG. 44). Um detector ótico é usado então para identificar os bioagentes potenciais baseados na saída do fóton das células emissoras que interagem com as partículas do aerossol. Este processo de coleta do aerossol e de entrega da célula emissora pode ser repetido diversas vezes em um disco. Esta característica permite que os múltiplos ensaios de célula emissora sejam realizados após diversos eventos de trigger sem mudar o CD.

Os materiais e os procedimentos apropriados para o uso na invenção são descritos em um detalhe adicional abaixo.

#### **CÉLULAS EMISSORAS**

As células emissoras (também referida neste como uma célula de sensor ou uma célula de CANARY) podem ser toda a célula procariótica ou eucariótica que tiver um receptor apropriado, sinalizando o percurso, e o método de saída de sinal, naturalmente, através da engenharia genética, ou através da adição química. A célula pode ser uma unidade

artificial ou extinta provida contanto que ela tem um receptor funcional, sinalizando o percurso, e o método de saída de sinal. Sobre a ligação de receptor de antígeno, como aos anticorpos, a célula mobiliza íons do cálcio dentro do citossol. Um exemplo de uma célula útil no dispositivo e nos métodos da invenção é uma célula B (isto é, uma célula B de um animal vertebrado de sangue quente ou frio que tem um maxilar ósseo) que possa ser geneticamente projetada para expressar um ou vários anticorpos monoclonais ligados à superfície. Um outro exemplo de uma célula útil no dispositivo é uma célula macrofágica, tal como a linhagem celular humana U937, que expressa um receptor Fc na superfície da célula. Um antígeno pode ser ligado a um anticorpo pela adição do anticorpo ao alvo e este complexo do anticorpo de antígeno se ligará ao receptor Fc na célula e estimulará a sinalização que resulta em um aumento no cálcio intracelular.

Um anticorpo monoclonal pode ser produzido por, por exemplo, imunização de um animal com o antígeno para ser detectado e colhendo a célula B do animal imunizado. O DNA que codifica o anticorpo monoclonal pode então ser isolado e transferido dentro de uma linhagem celular imortalizada e nas células selecionadas para a produção de um anticorpo monoclonal de superfície específico para que o antígeno seja detectado. As células B são úteis tanto para análises qualitativas quanto quantitativas, particularmente porque o sinal de emissão delas tipicamente não diminui significativamente enquanto o espécime alvo adicional lhe é exposto e também porque tal sinal de emissão é linear.

Alternativamente, a célula pode ser um fibroblasto. Entretanto, os fibroblastos não contêm a maquinaria de transdução de sinal necessária para transferir um sinal a partir da porção citoplasmática de um anticorpo de superfície aos armazenadores de cálcio na célula. Para superar este problema, um anticorpo de superfície quimérico pode ser expresso no fibroblasto. Este anticorpo quimérico contém uma seqüência de ácido amino citoplasmático derivada de um polipeptídeo (por exemplo, um receptor do fator de crescimento do fibroblasto) que possa transduz um sinal da superfície interna da membrana de plasma do fibroblasto aos armazenadores intracelular do cálcio. Assim, quando um antígeno se liga à porção extracelular do anticorpo quimérico para causar a agregação do anticorpo na superfície, a mobilização de cálcio é induzida. Uma estratégia similar que usa anticorpos quiméricos pode ser empregada para qualquer outro tipo de célula que não seja uma célula B, de modo que a célula seja apropriada para o uso nos dispositivos e nos métodos da invenção.

Aqui as células úteis nos dispositivos e nos métodos são aquelas projetadas reconhecer uma substância específica, incluindo aquelas que têm receptores em sua superfície que se ligam especificamente a essa substância. Um receptor preferido é um anticorpo ou anticorpo de cadeia simples, embora outros receptores apropriados incluam um receptor do mitógeno (tal como um receptor lipopolissacarídeo (LPS)), um receptor do neutralizador de impurezas do macrófago, um receptor de célula T, uma molécula de adesão celular, uma proteína de ligação de DNA

tal como a parte de uma enzima de restrição de seqüência específica ou fator de transcrição, RNA simples encadeado ou proteína de ligação de RNA duplo encadeado, um oligonucleotídeo complementar para uma seqüência do DNA ou do RNA a ser reconhecida, ou o outro receptor de ligação de ligando (por exemplo, Fas; citocina, interleucina, ou receptores de hormônio; receptores neurotransmissores; receptores odorantes; receptores de atração química, etc.) que ligarão especificamente a substância a ser reconhecida.

10 O receptor pode ser unido à superfície celular via um domínio de transmembrana, uma molécula de ligação de membrana que se liga especificamente ao receptor (como os receptores Fc que se ligam aos anticorpos), ou uma união covalente ou não covalente (por exemplo, biotina de estreptavidina, ligações de bissulfeto, etc.) para uma

15 molécula de membrana ligada. O receptor pode igualmente ser uma molécula quimérica; por exemplo, ele pode ter um domínio extracelular tal como um anticorpo, o anticorpo de cadeia simples, lecitina ou o outro domínio ou peptídeo de

20 ligação de substância específica, e um domínio intracelular tal como aquele do receptor de insulina, do fator de crescimento do fibroblasto, da outra proteína que provoca uma segunda cascata do mensageiro, etc. Em vez de se ligar diretamente à substância a ser reconhecida, o receptor pôde

25 especificamente se ligar a uma outra molécula ou objeto que por sua vez se liga especificamente à substância a ser reconhecida, como um anticorpo secundário, microesferas rotuladas, oligonucleotídeo de antígeno-conjugado; etc.

Alternativamente, somente um destas etapas de ligação pode necessitar ser específica. Por exemplo, o DNA ou o RNA que contêm seqüências específicas que podem ser retiradas da solução usando as sondas do oligonúcleotídeo conjugadas a um antígeno (ou diretamente a uma microesfera, ou em uma matriz), e um segundo conjunto de sondas de oligonucleotídeo de antígeno conjugado não específico recozidas por DNA/RNA alvo seria usado para estimular as células específicas para esse segundo antígeno. Também, as proteínas de ligação de ácido nucléico não específico (histonas, protaminas, proteínas de ligação RNA) expressas como quimeras na superfície da célula, ou os anticorpos contra àquelas proteínas de ligação, poderiam igualmente ser usados para detectar a presença de ácidos nucléicos após uma etapa de seleção de seqüência específica.

### **Anticorpos**

Qualquer tipo original de célula, nas regiões variáveis de ligação de antígeno de anticorpos monoclonais obtidas tanto como seqüência de DNA a partir de uma fonte pública, ou clonadas por RT-PCR de uma linhagem celular de hibridoma. RT-PCR é realizado usando conjuntos de iniciadores projetados para recozimento, na extremidade de prime 5, tanto para as regiões líder quanto região de estrutura da região variável, e na extremidade de prime 3 para a região constante.

As regiões variáveis de anticorpo são clonadas então dentro dos vetores de expressão que já contêm as regiões constantes para a cadeia de luz e pesada. O vetor da expressão da cadeia de luz descrito em Persic *et al.*, Gene

187:9 - 18, 1997 é especialmente apropriado para esta finalidade. VKExpress, descrito em Persic et al., contém o promotor EF-1 $\alpha$ , uma seqüência de líder, locais de clonagem múltipla, e o Ig Kappa constante da região e do sinal de poliadenillação. O vetor de expressão de cadeia pesada é derivado de Invitrogen de pDisplay. Este vetor contém um promotor CMV, uma seqüência de líder, um identificador HA, o local de clonagem múltipla e identificador de myc, seguido pelo domínio do transmembrana de PDGFR e pelo sinal de poliadenilação de hormônio de crescimento bovino.

pDisplay pode ser modificado para a expressão da cadeia pesada como segue. O domínio de transmembrana PDGFR de pDisplay é substituído com a região constante IgM murino sem o exon que permite a secreção. Isto assegura que a proteína permaneça ligada à membrana. O gene de resistência à neomicina pode ser substituído por alguns de um número de genes resistentes a antibiótico que incluem, mas não se limitam a, higromicina, bleomicina, puromicina, canamicina, e de genes do blasticidina. A região variável de cadeia pesada (ou alternativamente uma cadeia de luz) pode ser introduzida em um processo de duas etapas, usando o PCR da extensão de sobreposição, para remover de cada lado as identificadores HA e myc presentes de local clonagem múltipla de pDisplay. Um vetor pode igualmente ser desenvolvido para permitir a inserção de um produto de extensão de sobreposição que contém a região variável fundida a aproximadamente 300 pares base de região constante de IgM, de modo que a clonagem possa ser feita em uma única etapa.

Os exemplos abaixo foram implementados usando o procedimento de construção de vetor de anticorpo descrito imediatamente acima.

Um anticorpo que se ligue especificamente ao antígeno a ser detectado é uma molécula que se liga ao antígeno ou um epítopo do antígeno, mas não se ligue substancialmente a outros antígenos ou epítopos na amostra. Tais anticorpos podem ser cadeia simples quimérica (isto é, para conter seqüências de aminoácido de não-anticorpo) ou cadeia simples (isto é, a complementaridade que determina a região do anticorpo é formada por uma seqüência contínua de polipepetídeo).

Alternativamente, as células de produção de anticorpo de superfície podem ser obtidas do animal e ser usadas para preparar uma população monoclonal de células produzindo os anticorpos de superfície através de técnicas padrão, tais como a técnica de hibridoma descrita original por Kohler et al., *Nature* 256:495-497 (1975); Kozbor et al., *Immunol Yoday* 4:72 (1983); ou Cole et al., *MONOCLONAL Antibodies and Câncer Therapy*, Alan R. Liss Inc., pp. 77-96 (1985). A tecnologia para produzir células que expressam anticorpos monoclonais são bem-conhecidos (vide, por exemplo, *Current Protocols in Immunology* (1994) Coligan et al. (eds.) & de John Wiley & Filhos, Inc., New York, N.Y.), com as modificações necessárias para selecionar para os anticorpos de superfície mais preferíveis do que anticorpos secretados.

Alguns de muitos protocolos bem-conhecidos usados para linfócitos de fusão e linhagem celular imortalizada podem

ser aplicados com a finalidade de gerar uma célula produzindo um anticorpo monoclonal de superfície (vide, por exemplo, *Current Protocols in Immunology, supra*; Galfre et al., *Nature* 266:55052, 1977; Kenneth, In *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., New York, N.Y., 1980; e Lemer, *Yale J Biol Med* 54:387 - 402 (1981). Além disso, ordinariamente o versado habilitado apreciará que há muitas variações de tais métodos que igualmente podem ser úteis.

10 As células Policlonais que expressam anticorpos podem ser preparadas por imunização de um animal apropriado com o antígeno a ser detectado. As células que produzem as moléculas de anticorpo direcionadas de encontro ao antígeno podem ser isoladas do animal (por exemplo, do sangue) e  
15 purificadas adicionalmente por técnicas bem-conhecidas, tais como a filtração de seleção de células com receptores adequados (panning) a uma placa de Petri de antígeno revestido. Como uma alternativa para preparar células monoclonais, um ácido nucléico que codifica um anticorpo  
20 monoclonal pode ser identificado e isolado por seleção de uma biblioteca de imunoglobulina recombinante combinatória (por exemplo, uma biblioteca da exposição do fago do anticorpo) com o antígeno para isolar desse modo os membros de biblioteca de imunoglobulina que selecionam o antígeno.  
25 Os kits para gerar e selecionar bibliotecas da exposição do fago estão disponíveis no comércio (por exemplo, o Sistema de Recombinação de Anticorpo do Fago de Farmácia, Catálogo N° 27-9400-01; e o Kit de Exposição de Fago SurfZAP® de identificador, Catálogo N° 240612). Adicionalmente, os

exemplos dos métodos e os reagentes particularmente favoráveis para o uso em geração e em seleção da biblioteca da exposição do anticorpo podem ser encontrados dentro, por exemplo, Patente U.S. N° 5.223.409; Publicação N° WO 92/18619; Publicação PCT N° WO 91/17271; Publicação PCT N° WO 92/20791; Publicação PCT N° WO 92/15679; Publicação PCT N° WO 93/01288; Publicação PCT N° WO 92/01047 do PCT; Publicação PCT N° WO 92/09690; Publicação PCT N° WO 90/02809; Fuchs *et al.*, 9:1370 *Bio/Technology* 9:1370-1372 (1991); Hay *et al.*, *Human Antibod Hybridomas* 3:81-85 (1992); Huse *et al.*, *Science* 246:1275-1281 (1989); Griffiths *et al.*, *EMBO J.* 12:725-734 (1993).

Depois que o membro desejado da biblioteca é identificado, a seqüência específica pode ser clonada dentro de algum expressor de ácido nucléico apropriado (por exemplo, um vetor) e transformada em uma célula tal como um fibroblasto. O expressor pode igualmente codificar os aminoácidos operavelmente ligados à seqüência de anticorpo como apropriada para a célula que expressa o anticorpo. Como discutido acima, a seqüência de transmembrana citoplasmáticas de um receptor de fator de crescimento de fibroblasto pode ser ligada a um anticorpo de cadeia simples específico para que o antígeno seja detectado, de modo que a célula imobiliza o cálcio quando contatada com o antígeno. Embora as cadeias pesadas e cadeias leves de recombinação separadas possam ser expressas nos fibroblastos para formar o anticorpo quimérico, os anticorpos de cadeia simples são igualmente apropriados

(vide, por exemplo, Bird *et al.*, 9:132-137, 1991; e Huston *et al.*, *Int Rev Immunol* 10:195-217, 1993).

### **Moléculas de emissor de fóton**

A reticulação da substância desejada pelo receptor da  
5 célula de superfície deve provocar uma reação de  
sinalização dentro da célula. Uma reação de sinalização  
preferida é a cascata de segundo mensageiro encontrada em  
células B, em células T, em células de mastro, em  
macrófagos, e em outras células imunes, onde a reticulação  
10 dos receptores de superfície de célula ativam uma quinase  
tirosina, que então realiza fosforilase em fosfolipase C.,  
que divide então fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>)  
no inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) e no diacilglicerol; IP<sub>3</sub>  
abre então os canais de cálcio para liberar o cálcio dos  
15 armazenamentos intracelulares tais como o retículo  
endoplasmático ou para deixar dentro o cálcio extracelular,  
elevando desse modo a concentração de cálcio no citosol da  
célula. Dependendo do tipo de receptor, o tipo de célula, e  
método de sinalização desejada, cascatas alternativas de  
20 segundo mensageiro poderão ser empregadas, como uma cascata  
A de quinase de proteína cAMP cíclica de proteína G  
adenilila.

Um método deve ser provido monitorando a sinalização  
interna da célula em resposta às substâncias a serem  
25 identificadas. Caso a sinalização interna envolva um  
aumento no cálcio citoplasmático, um método de detecção  
preferido é uma molécula luminescente ou fluorescente  
sensível a cálcio, tal como o aequorin, obelin,  
talassicolin, mitrocomin (halistaurin), clitin (fialidin),

mnemopsin, berovin, Indo-1, Fura-2, Quin-2, Fluo-3, Rhod-2, cálcio verde, BAPTA, cameleons (A. Miyawaki *et al.*, (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 213540), ou moléculas similares. Antecipa-se que as intensidades relativas da luz e as características do armazenamento de célula de sensor permitidas usando moléculas sensíveis a cálcio podem variar dependendo da eficiência da produção de luz para a molécula emissora específica e da meia-vida da molécula emissora ativada que provê em alguns casos benefícios significativos (por exemplo, sensibilidade melhorada, detecção quantitativa ou qualitativa). As melhoras adicionais de desempenho podem surgir do uso de análogos estruturais dos co-fatores naturais de moléculas emissoras de fotoproteína. As várias tinturas fluorescentes sensíveis a cálcio que podem ser pegadas por células vivas estão disponíveis nas fontes comerciais, incluindo Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg. As proteínas tais como aequorin, obelin, talassicolin, mitrocomin (halistaurin), clitin (phialidin), mnemopsin, berovin ou cameleons poderiam ser adicionadas geneticamente, injetadas dentro das células, ou ser entregues por um identificador de percepção de proteína de HIV TAT (aproximadamente aminoácidos 47-57; A. Ho *et al.* Research Cancer 61, 474-477 (2001)) ou por outros meios. Caso desejadas, tais moléculas repórteres podem incluir sinais que têm como alvo alvejá-las para a face citoplasmática do retículo endoplasmático ou da membrana de plasma, ao interior das mitocôndria, ou a outras localizações onde a mudança na concentração local do cálcio pôde ser particularmente grande. Os métodos óticos de

detectar a atividade de outros pontos na reação de sinalização poderiam igualmente ser usados, como transferência de energia da ressonância da fluorescência (FRET) de grupos fluorescentes unidos aos componentes da reação de sinalização (S. R. Adams *et al.* (1991) *Nature* 349, 694-697). Onde a sinalização interna envolve um aumento na espécie de oxigênio reativo (por exemplo, radicais do ânion do superóxido, radicais de hidroxila, composto I ou II de peroxidase de rábano silvestre, etc.), um método de detecção preferido é uma molécula luminescente ou fluorescente sensível a oxigênio reativo, tal como a fotoproteína folasin (uma glicoproteína 34-kDa de molusco, do bioluminescente do *Pholas dactylus*) ou moléculas similares. Alternativamente, um gene repórter para qualquer luciferase podia ser ligado a um promotor induzido pela reação de sinalização. Em algumas células tais como células T e células de mastro, exocitose dos identificadores de reação de sinalização dos grânulos que contêm proteases tais como granzimas, triptases, ou quirnasas. Exocitose destas proteases poderia ser detectado por métodos calorimétricos ou fluorométricos (por exemplo, p-nitroanalina ou 7 amino-4-trifluormetil cumarina (AFC) ligado aos peptídeos divididos pelas proteases [S.E. Lavens *et al.* (1993) *J. Immunol. Methods* 166, 93; D. Masson *et al.* (1986) *FEBS Letters* 208, 84; R&D Systems]). Também, os microeletrodos ou outros métodos para detectar a atividade elétrica associada com o fluxo de cálcio ou outros fluxos de íon de sinalização são apropriados para monitorar a resposta na célula.

Uma molécula emissora apropriada é qualquer molécula que se emita um fóton em resposta às concentrações de cálcio citosólico elevadas, incluindo moléculas bioluminescentes e fluorescentes. Uma molécula emissora, a

5 proteína aequorin bioluminescente, é descrita em Button *et al.*, *Célula Calcium* 14:663-671 (1993); Shimomura *et al.*, *Nature* 227:1356-1357 (1970). Aequorin gera fóton por coelenterazina de oxidação, uma molécula química pequena. Coelenterazina difunde através das membranas celulares,

10 assim que coelenterazina ou um análogo desta puder ser adicionado ao meio de cultura de ambiente de células. Alternativamente, os genes que codificam as enzimas que fazem o coelenterazina podem ser introduzidos dentro das células. Em uma outra modalidade, proteína fluorescente

15 verde bioluminescente (GFP) (vide Chalfie, *Photochem Photobiol* 62:651-656 [1995]) ou proteína fluorescente CANARY (YFP) pode ser usada. Nesta modalidade, o citosol celular contém GFP e aequorin. Em resposta ao cálcio elevado no citosol, o aequorin doa a energia a GFP em um

20 processo de transferência de energia sem emissão. GFP emite então o fóton. Alternativamente, a molécula emissora pode ser uma molécula fluorescente sensível a cálcio (por exemplo, indo-1) que seja iluminada por um comprimento de onda de luz apropriada para induzir a fluorescência.

25 Aequorin, ou qualquer outra molécula emissora, pode ser introduzida na célula por métodos bem-conhecidos na técnica. Caso a molécula emissora seja uma proteína (como é o caso da aequorin), a célula pode conter um vetor de expressão que codifica a proteína (isto é, um ácido

nucléico ou um vírus que produz a molécula emissora quando introduzido em uma célula). Um vetor de expressão pode existir de modo extracromossomal ou ser integrado ao genoma da célula.

#### 5 **Identificadores/Antígenos conjugados**

Alguns ou vários antígenos ou identificadores podem ser adicionados (igualmente referidos neste como conjugados) às moléculas para prover um epítipo antigênico conhecido. Por exemplo, uns ou vários antígenos podem ser  
10 conjugados a um oligonucleotídeo para produzir um oligonucleotídeo conjugado antígeno com um epítipo antigênico conhecido. Uma molécula de antígeno conjugado pode compreender um antígeno ou os antígenos múltiplos que são qualquer um que seja igual ou diferente. Por exemplo, e  
15 sem limitação, um antígeno ou um identificador a ser conjugados a uma molécula para a detecção incluem antígenos pequenos tais como digoxigenin, digoxin, fosfocolina, fluoresceína ou outros fluorforos, e biotina, e os pepetídeos tais como HIS, VSV-G, FLAG, e multímero de  
20 C(AAKK) (como descrito em Corey, J. Am. Chem. Soc, (1995) 117:9373 - 4).

#### **Oligonucleotídeos**

Além das sondas de DNA e de RNA convencionais, uma variedade de ácidos nucléicos modificados foram mostrados  
25 para hibridizar de uma maneira de seqüência específica para alvejar seqüências de ácido nucléico. Estes incluem os ácidos nucléicos pepetídeo (PNA) (Nielsen *et al.*, (1991) Science 254:1497-1500), Bis- PNAs (Griffith *et al.*, (1995) J. Am. Chem. Soc. 117:831-832), a pinça de extremidade PNA

(Bentin (2003) *Biochemistry* 42:13987-13995), loop PD (Bukanov *et al.*, (1998) *PNAS* 95:5516-5520), PNAs que incorporam bases pseudocomplementares (Lohse *et al.*, (1999) *PNAS* 96 (21) 11804-11808), ou ácidos nucleicos fechados (Braasch e Corey (2001) *Chem. Biol.* 8:1-7). Uma variedade destes ácidos nucleicos modificados foram mostradas para diferir em características, em estabilidade, em afinidade, e em especificidade da hibridação, e poderiam ser usados no lugar dos oligonucleotídeos de DNA convencionais (revistos por Beck e por Nielsen, pp. 91-114, in *Artificial DNA: Methods and Application*. CRC Press, Y.E. Khudyakov and H.A. Fields eds.). Fixação de proteínas catiônicas, de peptídeos, ou de proteínas de ligação de DNA foi mostrada para melhorar a cinética da hibridação (Corey (1995) *J. Am. Chem. Soc* 117:9373-9374; Zhang *et al.*, (2000) *Nuc. Ac. Res.* 27 (17) 3332-3338).

A ligação de oligonucleotídeos foi mostrada para melhorar com a adição dos oligonucleotídeos auxiliares (O'Meara *et al.*, (1998) *Anal. Biochem.* 225:195-203; Barken *et al.*, *Biotechniques* 2004 36:124-132). A especificidade pode ser melhorada pela adição de sondas concorrentes de competidor de cabelo (hairpin) não rotulado (Huang *et al.*, (2002) *Nucleic. Ac. Res.* 30: (12) e (55).

A remoção de oligonucleotídeos não ligados depois da hibridização do alvo não é necessária para a detecção da seqüência do ácido nucleico, mas pode ser desejável. O oligonucleotídeo rotulado não ligado poderia ser removido usando uma variedade de técnicas convencionais de cromatografia, incluindo a exclusão de tamanho, a interação

hidrofóbica, ou a troca iônica, dependendo da química da sonda particular usada.

#### **Outras moléculas de ácido nucléico de ligação**

Oligonucleotídeos das moléculas não são somente as  
5 moléculas que podem identificar seqüências específicas de  
ácido nucléico. As proteínas são igualmente capazes de tal  
discriminação, e podem ser expressas na superfície da  
célula emissora, unida de modo recombinante a um domínio  
citoplasmático que, por ligação, poderia iniciar uma  
10 resposta de cálcio. Isto poderia incluir as proteínas de  
ligação de ácido nucléico unidas à porção Fc de anticorpos,  
por exemplo. A expressão de proteínas de ligação de ácido  
nucléico na superfície da célula emissora poderia eliminar  
tendo que desnaturar a hibridização de oligonucleotídeo  
15 prévia de ácido nucléico duplamente encadeado, e  
adicionalmente, o sistema produz todos os componentes  
necessários: nenhum oligonucleotídeo sintetizado oxigenado  
seria exigido. As proteínas de ligação de DNA específicas  
da seqüência específica incluem: (1) enzimas da restrição  
20 de DNA (preferivelmente com o local catalítico do DNA de  
corte removido ou inativado, por exemplo, & do L.F. Dorner  
& I.; Schildkraut (1994) Nucl. Acids Res. 22, 1068-1074);  
(2) fatores da transcrição ou outras proteínas específicas  
do DNA ou da RNA de ligação, especialmente aqueles que  
25 reconhecem seqüências originais do DNA ou do RNA em  
patógenos ou em organismos de interesse (por exemplo, HIV  
TAT transcription factor: C. Brigati *et al.* (2003) FEMS  
Microbiology Letters 220,57-65 poxvirus transcription  
factors: S. S. Broyles (2003) Journal of General Virology

84, 2293-2303). As células emissoras com tais receptores podiam ser projetadas reticular no DNA/RNA alvo tanto com uma seqüência repetida específica ou alternativamente duas ou mais seqüências únicas.

#### 5            **Oligonucleotídeos de captação**

Embora não seja necessário para a detecção, captação da seqüência do ácido nucléico alvo na sustentação sedimentável ou sólida pode melhorar a sensibilidade do ensaio. O DNA alvo encadeado simples pode ser capturado usando, por exemplo, os oligonucleotídeos biotina de rotulada de captação ligados a poliestireno estreptavidina revestida ou nas microesferas paramagnéticas. O material capturado pode ser separado do material não ligado pela centrifugação ou pela exposição a um campo magnético, como

10

15

20

25

apropriado. O uso de uma reação de ligação intermediária (avidin-biotin) em união do oligonucleotídeo com a microesfera não pode ser necessário como alguma interação que possa unir o oligonucleotídeo a uma sustentação sólida pode ser usada, incluindo a conjugação direta. Além disso, qualquer sustentação contínua a que o oligonucleotídeo de captação pode ser unido bastaria. Isto pode ser sob a forma de um arranjo bidimensional, em que os oligonucleotídeos específicos de captação são colocados em posições específicas sobre ao arranjo. Alternativamente, seqüências de ácido nucléico alvo podem ser capturadas de uma maneira não-específica (por exemplo, reticulação da resina de troca iônica, precipitação, histona ou protamina). A captação alvo concentrará também a seqüência de ácido nucléico alvo e/ou removerá os interferentes do ensaio.

### **Polivalência**

A estimulação de célula emissora é dependente do antígeno que parece multivalente à, célula emissora. Geralmente, isto pode ser realizado pelo menos de duas  
5 maneiras. Primeiramente, as cópias múltiplas do antígeno podem ser unidas a uma molécula alvo, por exemplo, hibridizando oligonucleotídeos antígeno conjugados múltiplos à seqüência do ácido nucléico alvo. Em segundo lugar, diversas cópias da seqüência de ácido nucléico alvo,  
10 cada uma com um único antígeno unido, podem ser ligadas umas as outras ou ligadas de forma bastante próxima entre si (por exemplo, unido a uma microesfera). Neste exemplo, a seqüência individual do ácido nucléico alvo não seria polivalente, mas a microesfera com cópias múltiplas da  
15 seqüência do ácido nucléico alvo unida apresentaria um antígeno polivalente.

### **Câmaras de reação**

As câmaras de reação apropriadas para o uso na invenção podem ser algum substrato ou recipiente em que as  
20 células emissoras e as partículas candidatas possam ser misturadas e contatadas entre si. Em uma modalidade, o recipiente de reação é um tubo de centrifugação (por exemplo, a microcentrifugação ou tubo Eppendorf). Como descrito neste, a centrifugação é um meio particularmente  
25 bem-adaptado para peletizar as partículas candidatas ou células emissoras, antes que outro seja conduzido para o primeiro pélete. Para um aumento adicional da peletização de partículas e de células, as paredes laterais do tubo podem ser revestidas com uma proteína carregada não-pegajosa

tal como a albumina de soro bovino para impedir a colagem de células emissoras às paredes laterais, e o fundo do tubo pode ser revestido com o poli-L-lisina para ajudar a assegurar que as partículas alvo permaneçam aderidas ao fundo do tubo. Outras proteínas ou moléculas que impeçam ou promovam a adesão de célula são conhecidas na técnica da biologia celular e são apropriadas para o uso na invenção.

Os tubos de centrifugação com geometrias de poço de amostra personalizadas podem prover uma modalidade adicional que use a centrifugação para aumentar interações da célula emissora com partículas de difícil sedimentação e reduzir a necessidade de personalizar a seqüência da rotação. Nesta modalidade a amostra contendo partícula a ser analisada é colocada em um tubo onde a largura máxima da câmara de amostra seja aproximadamente igual ao diâmetro de uma célula emissora. Mergulhar uma suspensão concentrada em célula emissora sobre a amostra seguida por uma centrifugação provoca um grande número de células emissoras empacotadas proximalmente através das partículas menores enquanto a geometria confinada aumenta a probabilidade da interação do anticorpo da célula emissora com partículas. A reticulação do anticorpo associado às células para a partícula captura a partícula de má sedimentação e extraíndo esta rapidamente para o fundo do tubo com a célula emissora onde a luz resultante pode ser observada por um dispositivo multiplicador de foto.

Em uma outra modalidade, as câmaras de reação são poços em um arranjo bidimensional, por exemplo, uma placa de microtitulação, ou pontos ou poços ao longo de uma

faixa, como mostrado nas figuras. Estes arranjos permitem a detecção multiplexada ou de amostras múltiplas e/ou de partículas alvo múltiplas. Para a entrega automatizada de partículas candidatas e/ou de células emissoras, tanto as câmaras de reação quanto o reservatório da célula coletora e emissora de espécime são endereçáveis pelo menos em duas dimensões. Os poços das disposições podem igualmente ser tratados com os revestimentos pegajosos e não-pegajosos como descritos acima para que os tubos de centrifugação facilitem o contato entre células emissoras e partículas candidatas.

#### **Coletores de espécime**

Os dispositivos diferentes podem ser usados para coletar amostras de, por exemplo, ar. Geralmente, um dispositivo de amostragem de ar tem uma câmara de coleta contendo líquido através ou ao lado do qual ar ou gás é passado completamente, ou contendo um filtro poroso que retenha particulados (por exemplo, partículas alvo) como o ar ou o gás passa através do filtro. Para as câmaras de coleta que contêm o líquido, o líquido de coleta pode ser centrifugado ou de outra maneira tratado para separar partículas do líquido. As partículas separadas são depositadas então em uma câmara de reação. Para câmaras de coleta que contêm um filtro (por exemplo, nitrocelulose), o filtro ou as porções de filtro podem atuar como a câmara de reação. Alternativamente, as partículas podem ser lavadas a partir do filtro, ou o filtro pode ser dissolvido ou de outra maneira removido das partículas. Uma câmara de coleta de filtro pode igualmente ser adaptada para coletar

partículas de um líquido (por exemplo, amostra da fonte de água ou fluido cérebro-espinhal) fluindo através do filtro. Além disso, como discutido acima, uma amostra líquida pode ser centrifugada para remover todo o particulado presente no líquido. Uma variedade de amostradores é conhecida e está disponível para ser usada com a presente invenção. Vide SKC, Inc., que vende o SKC BioSampler®. e outros dispositivos da amostra.

Outros amostradores de ar podem ser usados. Por exemplo, um dispositivo alternativo é o contêiner de amostragem de O-Célula-Ar (SKC, Inc.). Neste dispositivo, as partículas conduzidas pelo ar são aceleradas e feitas para colidir com um adesivo deslizante que seja diretamente apropriado para vários procedimentos de manchar e examinar microscopicamente. Os particulados de aerossol podem ser coletados usando a separação com inércia em um dispositivo conhecido como um elemento de impacte. Um fluxo de ar que contém partículas a serem coletadas é retirado do ambiente de interesse por dentro do projétil onde é direcionado para uma superfície para a colisão. Com parâmetros geométricos e taxas de fluxo apropriado no projétil, as partículas com inércia suficiente não seguirão as aerodinâmicas do fluxo, mas impactarão na superfície. Uma proporção significativa das partículas que impactam na superfície adere com as interações eletrostáticas e/ou de van der Waals e, desse modo, é coletada e concentrada. Desta maneira, as partículas de aerossol que contêm as proteínas (que incluem toxinas), os vírus, as bactérias (vegetativo e as formas de esporo), parasitas, pólen e outras substâncias detectáveis

podem ser coletados para a detecção usando uma variedade de tecnologias de ensaio disponíveis que incluem os dispositivos e os métodos neste.

5 A coleta de amostra seca para os bioensaios que usam um projétil de ar provê vantagens gerais sobre a coleta ar/líquido tradicional da amostra reduzindo ou eliminando os materiais de consumo fluidos e os mecanismos de transferência que reduz o custo do ensaio e simplifica a automatização. Em relação ao benefício particular para os  
10 dispositivos e métodos neste, a coleta que usa a colisão seca assegura que toda a amostra coletada esteja localizada na superfície antes da adição de células de sensor dos dispositivos e dos métodos neste, não obstante o tamanho das partículas individuais do analito. Nisto se consegue a  
15 localização de todos os analitos não obstante de seu coeficiente de sedimentação no fluido, maximizando desse modo a sensibilidade dos dispositivos e dos métodos neste e acelerando muitas implementações do ensaio eliminando uma etapa demorada.

20 Toda a superfície que retiver uma proporção de partículas que impactem nele e que seja compatível com bioensaios subseqüentes que se adequem à uma superfície de coleta. Os materiais apropriados incluem metais biocompatíveis, plásticos, vidros, cristais, aerogéis,  
25 hidrogéis, papéis, etc. Particularmente as configurações úteis destes materiais incluem os tubos de microcentrifugação, placas do multipoço usadas na separação (screening) de alto-produção, faixas contínuas, filtros, enchimentos de liberação de conjugado de imunoensaios de

fluxo lateral, etc. A eficiência de coleta pode ser aumentada por modificações da superfície de coleta incluindo: a adição de revestimentos que promovem a adesão de partículas biológicas (estes revestimentos podem ser químicos ou bioquímicos na natureza, por exemplo, polilisina), aspereza de superfície aumentada para aumentar a área de superfície disponível para a coleta, e geometrias de superfície personalizadas que promovem o depósito das partículas em regiões definidas na superfície. Além disso, as melhorias adicionais na eficiência de coleta podem ser conseguidas manipulando as cargas eletrostáticas na superfície de coleta e nas partículas entrantes tais que as forças atrativas adicionais são geradas.

As melhorias adicionais podem ser feitas ao coletor de colisão seca pelo uso de um concentrador de ar-a-ar a montante do coletor para aumentar o número de partículas em cada unidade de amostra de ar colidida na superfície de coleta. Isto pode significativamente reduzir a quantidade de tempo necessário para coletar um número suficiente de partículas de aerossol para prover resultados confiáveis para o detector.

Em um exemplo deste conceito de coleta, o projétil descrito na FIG. 23 foi configurado para coletar amostras de aerossol no fundo de um tubo plástico disponível no comércio. Um bico projeta-se para baixo no tubo e a saída é posicionada no raio de curvatura da superfície interna do tubo. Este posicionamento aumenta a probabilidade de colisão da partícula em cima do fundo do tubo onde as células de sensor do dispositivo mais provavelmente o

contatarão. Uma vez que a coleta é terminada, uma única gota que contém células de sensor do dispositivo está adicionada diretamente ao tubo que contém as partículas coletadas do aerossol, giradas por 5 segundos para acelerar a entrega da célula à superfície do tubo, e a luz emitida é medida usando-se um detector de fóton (por exemplo, PMT, CCD, fotodiodo, etc.). Usando este aparelho, os esporos bacterianos secos podem ser coletados de um aerossol e ser identificados diretamente com dispositivo optoeletrônico em menos de um minuto. Este método pode ser implementado com uma pluralidade de tubos usados para coletar amostras e um sistema automatizado para conduzir ensaios subsequentes. Um exemplo de como um sistema capaz de conduzir 10 ensaios independentes é mostrado nas FIGURAS 4, 6, 9, 12, e 15. Pela implementação de uma abordagem onde os ensaios sejam feitos capazes de procurar por analitos múltiplos em um único tubo (multiplexado) que o número de substâncias detectáveis para um único ciclo do ensaio pode ser maior do que o número de tubos disponíveis. Isto pode ser feito criando as linhagens celulares de dispositivo de detecção optoeletrônico individual que expressam uma pluralidade de receptores com a afinidade para analitos diferentes ou combinando linhagens celulares múltiplas com as especificidades diferentes em um único tubo.

A FIGURA. 4 é um diagrama esquemático de um sistema de sensor de advertência de aerossol biológico (BAWS) / sistema de sensor optoeletrônico. O módulo do trigger BAWS é usado para detectar preliminarmente a presença das partículas, por exemplo, aquelas de uma taxa predeterminada

de tamanho. Caso as partículas que encontram especificações sejam detectadas, BAWS aciona um concentrador de ar-a-ar que permite que as partículas de uma taxa particular de tamanho sejam coletadas e depositadas em um poço (por exemplo, câmara de reação, tubo) via um módulo de projétil seco. O módulo de projétil seco permite a coleta seca da amostra e está em uma comunicação com um módulo de seringa para a entrega da célula (por exemplo, emitindo células) em uma câmara de reação (por exemplo, tubo). Um módulo de transporte é usado para transferir o conjunto da câmara de reação (tendo umas ou várias câmaras ou tubos) a um módulo de centrifugação para a sedimentação ou a mistura da amostra e das células da partícula. O módulo de centrifugação pode estar, mas não precisa estar necessariamente, em comunicação com um módulo óptico/PMT para a detecção da emissão do fóton. Um módulo de controlador é útil para o controle da operação do sistema.

A FIGURA. 6 mostra um exemplo de um conceito do módulo de projétil seco. Neste exemplo um único (por exemplo, sistema de protótipo) assim como um, dispositivo de multicanal é ilustrado, incluindo os tubos individuais da amostra (por exemplo, tubos PCR) e os carreadores de tubo, em comunicação com os concentradores de ar-a-ar de onde a amostra de teste da partícula é coletada.

A FIGURA. 9 mostra um exemplo de uma célula de entrega que pode ser automatizada. As células de sensor (por exemplo, emitindo células) são introduzidas ao sistema por meio de um arranjo da seringa e da bomba da seringa, que pode incluir pipetas ou o outro equipamento de entrega.

Este tipo de conjunto permite a introdução múltipla e simultânea de células de sensor às amostras da partícula (por exemplo, amostras em câmaras de reação (por exemplo, tubos)).

5 A FIGURA. 12 mostra um exemplo de um conceito do módulo de centrífuga usado para realizar enrolamento das amostras da partícula ou amostras da célula. Os carreadores que têm os tubos de amostra são introduzidos via um mecanismo do carregamento em um conjunto de rotor que seja  
10 apropriado para receber os carreadores. O rotor realiza enrolamento das amostras. O conjunto do rotor está em comunicação com os módulos óticos para a coleta de sinal (por exemplo, emissão de fóton), e um motor indexado pode ser usado para permitir o alinhamento das câmaras das  
15 amostras com o detector (por exemplo, módulos do sistema ótico).

A FIGURA. 15 mostra um exemplo de um módulo ótico. Dependendo da configuração precisa, o módulo permite uma pluralidade de teste simultâneo das amostras (por exemplo,  
20 nas câmaras de reação, tubos). O carreador e os tubos são introduzidos na unidade de tal forma que eles estejam em comunicação com os conjuntos de lentes (por exemplo, refletores integrados, lentes) caso necessário, e finalmente um fotodetector (por exemplo, um PMT). O PMT  
25 produz os sinais que são emitidos então a um processador para o processamento e a um display.

A FIGURA. 21 ilustra um sensor de projétil seco /optoeletrônico integrado. Neste sensor os módulos descritos acima são montados em um arranjo linear com um

contêiner que mantém 30 carreadores que podem entregar a um módulo de transporte movido à correia do carreador. Este módulo de transporte move os tubos de ensaio seqüencialmente a partir do coletor para o módulo de entrega de célula ao módulo de centrifugação, e finalmente ao módulo de armazenamento confirmativo de amostra depois da conclusão da detecção de fóton. O tamanho total deste sensor integrado é de aproximadamente 54 polegadas de largura por 33 polegadas de altura por 22 polegadas de profundidade.

As amostras primitivas (real world) podem conter substâncias tanto para inibir o ensaio (negativo falso) ou causar uma resposta à ausência de antígeno específico (positivo falso). Em muitos casos, estas amostras podem ser tratadas antes do ensaio para remover estas substâncias. Por exemplo, as substâncias solúveis tais como detergentes ou fatores do soro podem ser removidas pela etapa de pré-centrifugação, onde o agente é concentrado no fundo do tubo e o líquido é substituído com o meio de ensaio (amostras Portal Protetor). Os particulados insolúveis, grandes podem ser removidos da amostra pela filtração, usando filtros comerciais do tamanho de um poro (3-5 $\mu$ m) que permite a passagem do agente, mas retêm o contaminador (amostras de diesel ou da fuligem). As amostras podem ser processadas rapidamente através dos filtros da seringa, adicionando somente alguns minutos ao tempo total do ensaio.

#### **Localização de espécime**

Como parte do coletor do espécime ou da câmara de reação, os mecanismos diferentes (à exceção da

centrifugação) podem ser implementados para facilitar o contato entre células emissoras e partículas candidatas. Por exemplo, o uso da eletroforese, focagem isoelétrica, dieletroforese, etiquetou (tag) magneticamente as partículas, e da mesma forma em dispositivos bioeletrônicos pode ser integrado em um sistema da invenção. Vide, por exemplo, Patente U.S. Nº 6.017.696 e outras patentes atribuídas a Nanogen, Inc.; Goater *et al.*, *Parasitology* 117: S177-189, 1998; e Patente U.S. Nº 5.512.439 e 4.910.148 e outras patentes atribuídas a Dynal AS.

Misturando uma amostra aquosa que contém partículas alvo (as partículas aqui podem ser qualquer coisa reconhecida pelas células emissoras de proteínas/toxinas, vírus, bactérias, parasitas, ácidos nucleicos, etc.) com uma porcentagem dos meios que contém resultados das células emissoras no contato da célula de partícula que conduz ao aumento transiente na taxa de emissão de fóton. O tempo entre o início do processo de mistura e a taxa máxima de emissão depende da resposta característica das células particulares à estimulação assim como o tempo em que a mistura ocorre (o tempo de mistura) e o momento típico para que as partículas e as células entrem em contato após a mistura (o tempo da difusão).

Por causa de uma taxa de fundo de fótons detectados existirá mesmo na ausência das partículas alvo (emissão da célula de fundos e ruído térmico no detector de fóton e em sua eletrônica, por exemplo), os fóton emissores das únicas interações da célula alvo podem ser difíceis de distinguir deste fundo. Para ser útil como um sinal, deve haver um

aumento significativo na taxa de fótons detectados sobre aquele do fundo. Para uma dada amostra, esta taxa é maximizada quando o tempo de mistura e o tempo da difusão são minimizados. Outros sinais possíveis em que a partícula

5 alvo está presente em uma amostra incluem: um aumento no número total de fótons detectados em um período de tempo acima daquele do fundo sozinho, de uma mudança nas estatísticas de fótons detectados, ou de uma mudança nas qualidades espectrais dos fótons detectados.

10 O tempo da difusão pode ser minimizado reduzindo a distância média entre a partícula e a célula após a mistura. Isto pode ser realizado localizando as partículas e/ou as células dentro a um volume pequeno, freqüentemente uma camada, dentro do volume misturado maior. Entretanto, o

15 momento de localizar as partículas e/ou as células pode ser mais longo do que o momento de resposta característica das células. Mistura entre partículas e células sobre esta localização prolongada poderá produzir uma taxa mais baixa de emissão de fóton, e conseqüentemente de um sinal mais

20 baixo, aumentando o tempo médio entre emissões. Para evitar isto, um ou ambos devem estar localizados separadamente, ao minimizar o contato entre elas. Esta localização pode igualmente conduzir a um momento de mistura reduzida.

Geralmente, os meios para mover partículas ou células

25 incluem o seguinte: sedimentação (pela gravidade ou pela centrifugação); fluxo fluido (compelido ou convectivo); forças elétricas (eletroforese e dieletroforese); forças magnéticas (que usam microesferas magnéticas); e acústicos/ultrassônicos (onda estacionária ou constante).

A localização exige meios para mover as partículas e/ou as células combinadas com uma barreira onde as partículas e/ou as células possam coletar, como a superfície sólida de um canal ou um recipiente, a superfície de um filtro, ou a barreira de energia potencial que cerca um mínimo do campo elétrico. Os exemplos incluem: sedimentação (que localiza células na superfície de uma câmara); colisão de ar (colidida por bastão de partículas ou ajustada em uma superfície de coleta); filtração (as partículas ou as células coletadas sobre a superfície ou dentro do corpo de um filtro); as partículas ou as células da captação de afinidade podem estar localizadas com as interações de ligação específicas ou não-específicas); captação magnética (as microesferas magnéticas foram retidas contra uma superfície sólida, uma superfície de filtro, ou no corpo de um filtro por forças magnéticas localizadas; as microesferas podem ou não podem ter a química de superfície para promover a fixação das partículas ou das células); electroforese (partículas somente carregadas; coleta sobre a uma superfície do eletrodo); e dielectroforese (positivo: coleta das partículas ou das células sobre a uma superfície do eletrodo; negativo: coleta em uma região de campo mínimo).

A localização e a mistura das partículas e das células podem ser conseguidas combinando os métodos acima, assim como outros. Na tabela abaixo, os exemplos de várias combinações de localização/detector são providas. Certo dos exemplos representativos ilustrando métodos para localizar as partículas ou as células bidimensionais, permitindo a

melhoria na sensibilidade ou a discriminação entre partículas diferentes caso uma disposição de detectores de fóton (que incluem um CCD) ser usada contra um único detector de fóton (tal como um PMT).

<b>EXEMPLO</b>	<b>Método de localização de células</b>	<b>Método Delocalização De partículas</b>	<b>Mistura: partículas ou células /meios</b>	<b>Detector</b>
Centrifugação	Centrifugação (curta)	Centrifugação (longa)	Células/ Sedimentação (cent.)	Único
Célula fluida	Sedimentação e fixação à superfície	Células acima de Canal superficial	Partículas/ Sedimentação (grav.)	Único
Células Fluidas (linhagens celulares Múltiplas)	Sedimentação e fixação de superfície	Células acima de Canal superficial	Partículas/ Sedimentação (grav.)	Formação de imagem
Célula fluida/ Microesfera Magnética	Sedimentação e fixação de superfície	Captação de microesferas localizadas	Partículas (em microesferas/ sedimentação (grav.)	Formação de imagem
	Sedimentação e fixação de superfície	Células acima de Canal superficial	Partículas/ eletroforese	Único
Faixa/ Material	Fluxo (em Material)	Colisão de ar (faixa)	Células/ Sedimenta-	Único

absorvente	absorvente		ção (grav.)	
Colisão de ar	Centrifugação (curta)	Colisão de ar (faixa)	Células/Sedimentação (cent.)	Único
Preparação Única/Magnética	Sedimentação de superfície	Micro-Esferas Magnéticas Em superfície de filtro	Partículas (em micro-esferas/Sedimentação (grav.))	Único
Células de Pasta fluida	Células em superfície de filtro		Células de pasta fluida	Único
Fluxo contrário	Células retidas em superfície de filtro por centrifugação	Retido em superfície de filtro	Células de contenção de pasta fluida/partículas para cent. Compelida	Único
Bobina dieletroforética de tubo de centrifugação	Superfície de filtro em centrifugação	Retido em fluxo por força ic dieletroforética	Células/Sedimentação (cent.)	Único
Dieletroforese de onda corrente	Sedimentação e fixação à dieletroforese de onda	Dieletroforese de onda corrente	Partículas/Sedimentação (grav.)	Único

	corrente			
Tubo de membrana dissolvível	Compartimento separado	Centrifugação (longa) em membrana dissolvível	Células ou dieletroforese de partículas/onda corrente	Único
Acústico/Untrassônico			Dissolução de membrana e sedimentação (cent.)	

#### EXEMPLOS DE LOCALIZAÇÃO

Em cada um dos seguintes exemplos, supõe-se, a menos que indicado de outra maneira, que a amostra é uma porcentagem da solução aquosa compatível com vida útil curta da célula, contendo possivelmente partículas alvo (embora as descrições abaixo suponham a presença de partículas). Uma amostra aquosa pode ser obtida de ambiente, clínico, ar/líquido, chumaço lavado, ou outras amostras. Uma amostra de ar pode ser obtida de uma corrente de ar conduzido (amostrador de ar ou coletor de superfície), da captação eletrostática, ou das partículas conduzidas por via aérea estabelecidas. As referências às células devem ser compreendidas com o significado de células emissoras em meios aquosos que são compatíveis com suas vida e funções. Uma partícula e uma célula postas em contato resultam na emissão de alguns ou vários fótons. Detector de fóton único ou de conjunto existe externamente à câmara em que a amostra e as células são misturadas, e

pode haver uns elementos óticos adicionais para realçar a captação e a detecção de fótons emissores (tais como espelhos, lentes, canos de luz, etc.) tanto do lado externo quanto do lado interno da câmara. As câmaras também são adotadas como parcialmente ou totalmente transparentes ou para ter outros meios que permitam que os fótons emissores alcancem o detector. As descrições adicionais de modalidades específicas da invenção são providas nos exemplos.

#### 10 **Centrífuga**

Uma amostra pode ser centrifugada em uma câmara por um momento suficiente para sedimentar as partículas. As células podem ser introduzidas à câmara sem perturbar as partículas e momentaneamente ser centrifugadas para sedimentá-las nas partículas. A detecção do fóton pode ocorrer durante ou, mais tipicamente, após o enrolamento.

#### **Captção de afinidade (captção de superfície)**

Uma amostra pode ser introduzida em um tubo de microcentrifugação, na placa de multipoço, na unidade de filtro, ou em outro dispositivo apropriado onde alguma porção da superfície em contacto com a amostra foi modificada para poder ligar e reter as partículas que podem estar presentes na amostra com as interações de ligação específicas ou não-específicas. A ligação não-específica pode ser causar o avanço via as interações eletrostáticas/troca iônica, interações hidrofóbicas, interações hidrofílicas, etc. A ligação específica pode causar o avanço pelos componentes de imobilização para a superfície que se liga aos substratos nas partículas (por

exemplo, anticorpos, receptores, glicoproteínas, proteínas, peptídeos, hidratos de carbono, oligonucleotídeos, etc.), ou pelos componentes de imobilização que são ligados pelos receptores na superfície das partículas (moléculas pequenas, peptídeos, proteínas, hidratos de carbono, etc.).

#### **Captação de Afinidade (Para Substrato Móvel)**

Similar à captação de afinidade em uma superfície, mas sendo em partículas são ligados aos substratos móveis (microesferas poliméricas, células, moléculas carregadas, microesferas magnéticas, bactérias, etc.) que provêm meios adicionais de mover e/ou de localizar as partículas ou as células pelos vários métodos que incluem aqueles descritos neste.

#### **15 Células emissoras**

Células emissoras podem ser introduzidas a uma célula de fluxo superficial e ter permissão de se unir à superfície inferior; as células não-aderentes podem ser removidas pelo fluxo adicional. Uma amostra é introduzida, deslocando muitos meios de célula, e as partículas podem sedimentar para fora das células unidas. Os fótons são emitidos enquanto as partículas contatam células.

#### **25 Célula de Fluxo (Linhagens Celulares Múltiplas)**

Similar à célula de fluxo, com as regiões distintas de célula emissora sensível às partículas alvo diferentes. A detecção de fóton pelo detector da imagem latente para permitir a identificação de quais células são estimuladas,

e, conseqüentemente, que alvejam partículas que estão presentes na amostra.

#### **Célula de fluxo (microesfera magnética)**

Isto é similar à Célula de Fluxo. As microesferas magnéticas apropriadas são misturadas com a amostra, permitindo que as partículas alvo unam-se às microesferas. Estas microesferas envolvidas podem ser introduzidas na célula de fluxo onde um campo magnético localizado forte (devido a um ímã permanente ou a um eletroímã) as captura na superfície acima das células unidas. Mistura pode ser iniciada removendo a força magnética e permitindo que as microesferas se sedimentem nas células, ou movendo a força magnética para atrair as microesferas para a superfície a que as células são unidas.

#### **Célula de Fluxo (Campo Elétrico)**

Similar à Célula de Fluxo, com a superfície para a qual as células se unem e um paralelo para esta estar separada de eletrodos (pelo menos um de tais deve ser transparente). Uma amostra pode ser introduzida, deslocada muito dos meios da célula. Uma tensão CC apropriada é aplicada entre os elétrodos e as partículas que são movidos para as células unidas pela eletroforese.

#### **Faixa/Material Absorvente**

Uma amostra de ar, contendo possivelmente partículas alvo, pode ser colidida em uma superfície transparente, que possa ser rígida ou flexível (por exemplo, uma faixa), porosa ou não porosa. Um material absorvente ou wick pode ser unido, cercando a área de colisão ou, no caso de uma superfície porosa, no lado oposto dessa superfície. As

células podem ser colocadas na área de colisão, e, devido ao material absorvente, os meios excessivos serão absorvidos, reduzindo o volume e a profundidade dos meios que carregam as células e que as trazem para mais perto das partículas. As células sedimentam para fora nas partículas colididas ou, são extraídas adicionalmente para elas pelo fluxo caso a superfície seja porosa em relação ao material do material absorvente por detrás.

#### **Colisão de Ar**

Uma amostra de ar, contendo possivelmente partículas alvo, pode ser colidida dentro de uma câmara (reparada e inicialmente esvaziada) que é apropriada para a centrifugação. As células podem ser introduzidas à câmara sem interromper as partículas e momentaneamente ser centrifugadas para serem sedimentadas nas partículas. A detecção do fóton pode ocorrer sem, durante, ou, mais tipicamente, após o enrolamento.

#### **Dispositivo de Filtro/Microesfera Magnética**

Um dispositivo de filtro sem seringa modificado, consistindo em uma câmara e em um êmbolo apropriado (Whatman™, Mini-Uniprep™, ou similares), pode ser carregado pelas células que têm a permissão de se unirem à superfície de fundo da câmara; as células não unidas podem ser tiradas ao lavar. Uma amostra pode ser introduzida à câmara junto com microesferas magnéticas com uma afinidade de superfície apropriada. Um êmbolo modificado por um apropriado ímã inserido no interior e fixo próximo a parte traseira do filtro pode ser inserido dentro da câmara até que o ar capturado escape através do filtro. Este conjunto pode ser

invertido e (possível após um momento em que se permite que  
as microesferas se sedimentem na superfície do filtro) a  
câmara foi puxada para baixo do atuador. As microesferas e  
as partículas magnéticas podem se acumular na superfície do  
5 filtro pela filtração, pela sedimentação, e pela atração  
magnética. As partículas podem se unir às microesferas  
magnéticas ou ser travadas entre elas. Para reinverter o  
conjunto, as partículas, são mantidos fora das células  
pelas microesferas magnéticas que, são mantidas por sua vez  
10 pelo ímã dentro do êmbolo. A remoção desse ímã libera as  
microesferas, e as partículas, que se sedimentam através da  
distância curta das células.

#### **Células Passadas de Fluxo**

Uma ou várias camadas de células podem estar com  
15 permissão para se sedimentarem na superfície de um filtro  
ou membrana apropriada no fundo de uma câmara. Uma amostra  
pode ser introduzida à câmara acima das células e ser  
aplicada pressão (pelo êmbolo ou pela bomba externa, por  
exemplo). Na medida em que os fluxos de amostra passam  
20 pelas células, que estão em contato íntimo, as partículas  
são trazidas para dentro do limite de perto das células,  
permitindo o contato.

#### **Fluxo Contrário**

Uma ou várias camadas de células podem ter permissão  
25 para se sedimentarem na superfície de um filtro ou de uma  
membrana apropriada no fundo de uma câmara "de célula". Uma  
amostra pode ser colocada em uma câmara "de amostra"  
separada que é conectada por algum canal de fluxo à câmara  
da célula em um ponto abaixo do filtro. As câmaras podem

ser dispostas de acordo com uma outra tal como, em uma centrífuga, a câmara de amostra está mais próxima do eixo de rotação; o nível do fluido na câmara de amostra que está mais próxima do eixo de rotação do que o fluido na câmara de célula. Por meio disto, durante a rotação da centrífuga, o fluido fluirá entre as câmaras que buscam uma distância comum do eixo de rotação. Isto pode forçar alguma das amostras para cima do filtro que suporta as células e passar as células que estão sendo mantidas contra esse fluxo pela força centrífuga de fora. Na medida em que os fluxos de amostra passam pelas células, que estão em contato íntimo, as partículas são trazidas para dentro do limite próximo das células, permitindo o contato.

#### **Filtro de Tubo Centrífugo**

Uma amostra pode ser introduzida no cesto de filtro de um filtro do tubo centrífugo com um tamanho de interrupção apropriado. Sob condições apropriadas da centrífuga, a amostra será forçada através do filtro, acumulando as partículas maiores do que o tamanho de interrupção na superfície do filtro. As células podem ser adicionadas ao cesto de filtro e sofrer uma rápida centrifugação para trazê-las à superfície do filtro e das partículas.

#### **Retenção Dieletoforética**

Similar à célula de fluxo, mas sendo que com os eletrodos apropriados ou algumas das superfícies ou das projeções dentro da célula de fluxo. Uma amostra pode ser introduzida pelo fluxo contínuo passando pelos eletrodos, que pode estar conectado e eletricamente conduzido para junto à fonte externa. Para uma combinação apropriada de

taxa de fluxo, frequência, forma de onda, e amplitude, partículas podem ser guiadas e capturadas em uma região de intensidade de campo elétrico mínimo acima das células pela dieletroforese negativa. Após o fluxo ter parado e ter mudado a impulso elétrico dos eletrodos (que incluem possivelmente uma tensão CC entre alguns eletrodos para criar uma força eletroforética), a partícula pode sedimentar ou ser conduzida (pela eletroforese ou pela dieletroforese positivo) nas células unidas.

#### 10 **Dieletroforese de Ondas Correntes**

Em uma câmara cilíndrica superficial, os eletrodos apropriados (talvez transparentes) podem ser fabricados em uma ou em ambas as faces paralelas, incluindo um eletrodo planar central para coletar partículas, um eletrodo em torno da margem, e um conjunto de eletrodos espirais (tanto na mesma superfície quanto no centro ou na superfície oposta). Uma amostra pode ser introduzida à câmara, e a um CC potencial aplicado entre os eletrodos periféricos e centrais para atrair as partículas para o eletrodo central pela eletroforese. Por uma troca de fluidos, as células podem ser introduzidas à câmara. Energizar os eletrodos espirais com as tensões AC de deslocadas apropriadas pode varrer (sweep) as células para o centro pela dieletroforese de ondas correntes, onde elas podem sedimentar nas partículas.

#### 25 **Tubo de Membrana Dissolvida**

O uso pode ser feito em uma membrana dissolvível em ouro eletricamente atuada para manter o isolamento entre partículas alvo e células emissoras durante a localização

das partículas pela sedimentação centrífuga. Tanto as partículas podem ser sedimentadas em uma membrana sobre as células (como mostrado na FIG. 20), quanto as células podem ser retidas fora do fundo da câmara por uma membrana que tem a excepção de um fundo de uma câmara separada (talvez uma inserção). Em um ou outro caso, depois que a membrana tem de ser dissolvida pela ativação elétrica, as partículas e as células são misturadas (mixed) pela sedimentação, possivelmente uma centrífuga.

10

### **Acústicos/Ultrassônicos**

A concentração de partículas pode ser realizada pela utilização de sinal acústico ou ultrassônico. As partículas podem acumular em nós em um padrão de onda de lixamento, ou ser móveis por um padrão de ondas correntes. As células podem igualmente ser movidas desta maneira, ou ser entregues por alguns de diversos meios discutidos acima.

15

### **Detecção de toxina**

A fim de detectar antígenos monovalentes, é necessário induzir a reticulação dos anticorpos de superfície usando uma de duas estratégias gerais. Primeiramente, um pode expressar dois locais de ligação independentes na superfície da célula, tais que duas moléculas do receptor possam se ligar a um único ligando. Alternativamente, um local de ligação pode ser expresso na superfície da célula caso o ligando seja apresentado à célula de uma maneira em que parece ser polivalente. Os seguintes são exemplos específicos sendo usado o modelo de reconhecimento de antígeno de anticorpo.

25

Primeiramente, dois anticorpos podem ser expressos na superfície de uma única linhagem celular, cada um específica para epítomos diferentes de uma molécula individual (epítomos 1 e 2). A ligação de uma única molécula a dois anticorpos (um anticorpo contra o epítomo 1 e um outro anticorpo contra o epítomo 2) iniciaria a reticulação e a emissão de luz. Mais especificamente, uma única linhagem celular B é projetada para expressar dois anticorpos independentes, cada um reconhece um epítomo diferente em uma única molécula. A presença de antígeno monomérico é agora capaz de ligar os anticorpos de superfície, tendo por resultado  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular aumentado e emissão de luz por aequorin. Uma linhagem celular que expressasse anticorpos funcionais contra os *Y. pestis* e *F. tularensis* (além do anticorpo PC expressado endogenamente) foi testada (vide Exemplos). Cada um destes agentes é reconhecido independentemente por esta linhagem celular, indicando que ambos os anticorpos são funcionais e demonstrando que as células emissoras são capazes de expressar dois anticorpos funcionais simultaneamente.

Um outro ensaio potencial é a sensibilidade do dispositivo e dos métodos optoeletrônicos a um antígeno que não possa ser peletizado usando a força centrífuga. O antígeno F1 de *Yersinia pestis* existe como um polímero de baixo peso molecular na solução, e é conseqüentemente não sedimentável em nosso ensaio. Entretanto, as células B que expressam o anticorpo contra o F1 são capazes de detectar o antígeno solúvel de F1 em 5 ng/ml. Isto se compara favoravelmente com as técnicas atuais do imunoensaio e

demonstra que o dispositivo optoeletrônico pode ser completamente sensível aos agentes solúveis. Uma experiência complementar foi realizada usando-se o antígeno do fosforilcholina conjugada a albumina de ovo. A  
5 habilidade deste antígeno pequeno de estimular o anticorpo reticulado na superfície da célula indica que este antígeno do peso molecular baixo, contendo cópias múltiplas de epítopos de PC, é capaz reticular eficazmente os anticorpos de superfície e gerar a emissão do influxo e do fóton de  
10 cálcio.

Uma segunda estratégia pode melhorar o limite de detecção para os antígenos monovalentes mostrados acima aproveitando-se o formato centrífugo. Esta abordagem utiliza um esquema onde um dos anticorpos da toxina é  
15 exposto na superfície das bactérias benígnas e do segundo anticorpo na superfície de células B. A toxina pode agora ser sedimentada pela centrifugação, e as células B expressam o segundo anticorpo adicionado. Pela razão dos antígenos múltiplos serem imobilizados na superfície das  
20 bactérias, a toxina parecerá essencialmente polivalente à célula B, e iniciará um evento de reticulação e emissão de fóton. Mais especificamente, o anticorpo contra o epítipo 1 de um antígeno monomérico (por exemplo, toxina) é exposto na superfície das bactérias. A toxina solúvel liga-se a  
25 estes anticorpos, revestindo as bactérias com o antígeno da toxina. Estas bactérias de toxina revestidas são sedimentadas pela centrifugação antes da adição de células B que expressam o anticorpo contra o epítipo 2. Reticulação de anticorpos de célula B resulta na emissão de luz pelo

aequorin. Os resultados experimentais desta estratégia demonstram a praticabilidade de detecção de antígenos de superfície bacterianos, e a sensibilidade aumentada resultando da sedimentação daquelas bactérias antes da adição de células B. As abordagens similares podem igualmente ser usadas para que qualquer agente mal sedimentado melhore sua apresentação às células B.

### **Reticulação**

A reticulação de partículas alvo pode ser conseguida por qualquer dos meios conhecidos. Por exemplo, reticulação pode ser conseguida usando um ou vários agentes ou moléculas intermediárias tais como um peptídeo, um anticorpo, um composto químico, um anticorpo, biotina, estreptavidina, além disso, reticulação pode ser realizada via a ligação covalente ou não-covalente. Os métodos para reticulação igualmente incluem a precipitação ou a fixação de uma fase sólida via os ligandos, os anticorpos ou os grupos funcionais químicos, como são conhecidos na técnica.

### **Ensaio de Multiplexação**

A seguir está uma descrição de como as misturas da célula B podem ser usadas para aumentar o número de antígenos detectáveis sem aumentar o número dos canais de detecção (tubos, etc.). A maneira mais simples de detectar analitos múltiplos é usar um único tipo da célula emissora por canal de detecção e aumentar o número de ensaios da célula aumentando o número de canais da detecção. Isto é aceitável para um pequeno número de ensaios, mas à medida que aumenta o número de analitos adicionados, o processo torna-se mais complexo e o recurso intensivo. É possível, entretanto,



(A estenografia conveniente será utilizada daqui por  
 diante onde as linhagens celulares para agentes individuais  
 são rotuladas A através de uma letra que corresponde ao  
 número de linhagens celulares, e os números de canal serão  
 5 escritos para indicar que canais são exigidos para detectar  
 positivamente cada agente individual como se segue-123:  
 canais 1,2,3 de meio F todos devem ser de registro positivo  
 para o ID F).

Canal 1	Canal 2	Canal 3	Canal 4
A, B, G, F,	B, C, H, I	F, C, D, I	D, E, G, H
I, K, L, M	J, L, M, N	J, K, M, O	J, K, L, M
1:A	23:C	123:I	1234:M
2:N	24:H	234:J	
3:O	34:D	134:K	
4:E	12:B	124:L	
	13:F		
	14:G		

Uma fórmula que personifica a razão que descreve  
 10 simplesmente o número de ensaios independentes que podem  
 ser acessados por um dado número de canais, coloca que  
 todos os ensaios são misturados na mesma proporção é:

#Ensaio de célula =  $2^n - 1$  onde n é o número de canais

E o número de ensaios de célula que precisam ser  
 15 misturados em cada canal é dado por  $2^{(n-1)}$ .

Assim, para se misturar ao mesmo tempo 16 linhagens  
 celulares B diferentes, 5 canais são necessários para  
 examinar 31 ensaios diferentes. O projeto para um sistema  
 de 10 canais poderia, de fato, ser usado para prover ID  
 20 para 31 agentes separados com os controles negativos

simultâneos (5-canais de ID positivo, 5-canais de controle negativo).

As misturas de canal e a correlação positiva de detecção para um sistema de 4 canais (15 ensaios diferentes) são mostradas abaixo:

Canal 1	Canal 2	Canal 3	Canal 4
A, B, G, F	B, C, H, I	F, C, D, I	D, E, G, H
I, K, L, M	J, L, M, N	J, K, M, O	J, K, L, M
1:A	23:C	123:I	1234:M
2:N	24:H	234:J	
3:O	34:D	134:K	
4:E	12:B	124:L	
	13:F		
	14:G		

Sem elaboração adicional, acredita-se que a pessoa qualificada pode, baseando-se na divulgação acima e nos exemplos abaixo, utilizar a presente invenção em toda a sua extensão. Os seguintes exemplos devem ser interpretados como meramente ilustrativos de como o versado na técnica pode praticar a invenção, e não são limitativas do restante da divulgação de nenhuma maneira.

#### EXEMPLOS

A FIGURA 1 é um diagrama esquemático que mostra os componentes celulares gerais da invenção. Uma célula (aquí uma célula B) que contém uma molécula emissora (aquí aequorin) tem os anticorpos presentes em sua superfície. Estes anticorpos são específicos para um antígeno em uma partícula alvo, tal como um agente de guerra biológica. A ligação da partícula alvo aos anticorpos na célula B traz

dois ou mais anticorpos fechados entre si na superfície da célula, causando uma cascata que de transdução de sinal que conduz à liberação de cálcio de armazenamentos intracelulares dentro do citoplasma. Este aumento na  
5 concentração citoplasmática do cálcio faz com que o aequorin emita um fóton. O fóton então é capturado e registado por um dispositivo multiplicador de foto, tal como um CCD. Assim, um biossensor celular pode ser executado usando as células que têm anticorpos de  
10 superfície funcionais e que contêm uma molécula emissora citoplasmática que responda à concentração aumentada do cálcio.

Tal como um sistema de detecção de Baseado em célula provê a detecção rápida, sensível, específica, exata, e  
15 flexível de qualquer antígeno em qualquer partícula alvo. Com respeito à flexibilidade, o sistema pode ser modificado para alvejar qualquer partícula ou grupos de partículas. Em um exemplo, uma única célula emissora pode conter uma pluralidade de tipos do anticorpo, cada tipo sendo  
20 específico para grupos não-sobrepostos de partículas alvo. Esta única célula emissora pode então ser usada para identificar imediatamente um gênero da espécie da partícula alvo.

Em um segundo exemplo, uma câmara da reação pode  
25 conter dois tipos de células emissoras. Um tipo de célula emissora contém os anticorpos que são específicos para um gênero de partículas alvo (por exemplo, bactérias) e emite um fóton de um primeiro comprimento de onda em resposta ao contato com qualquer membro do gênero. O segundo tipo de

célula emissora contém os anticorpos que são específicos para uma espécie particular dentro do gênero (por exemplo, *Yersinia pestis*) e emite um fóton de um segundo comprimento de onda diferente do primeiro comprimento de onda em resposta ao contato com a espécie. Este arranjo oferece a exatidão extremamente elevada reduzindo ou eliminando sinais positivos falsos. Somente quando os fótons do primeiro e segundo comprimento de onda são detectados, um evento positivo será registrado. Este assentamento de especificidades da célula emissora pode ser estendido a mais de dois níveis quando necessário para reduzir ou eliminar sinais positivos falsos.

A FIGURA 2 é um diagrama esquemático de uma arquitetura geral e do uso do ambiente para a invenção.

A FIGURA 3 é um diagrama esquemático da biologia molecular empregada em uma modalidade da invenção. Neste exemplo, uma linhagem celular B universal expressa uma molécula emissora (por exemplo, aequorin), mas não expressa anticorpos transformando a base para gerar as células B que podem expressar todo o anticorpo específico para qualquer antígeno. Um vetor da expressão do anticorpo é introduzido na célula B universal, selecionado para a presença do vetor de expressão, e expandido para o uso em um sistema de detecção da invenção. Usando esta estratégia, conjuntamente com pDisplay e VKExpress (descritos na seção acima "Anticorpos"), células emissoras de alvo específico foram geradas para uma variedade de alvos. Células emissoras específicas para o vírus da doença da Febre Aftosa (FMDV), vírus Venezuelano da Encefalite Equina (VEE), *Yersinia*

*pestis*, *Francisella tularensis*, *Brucélulaa* spp., as cepas 01 e 0139 de *Vibrio cholera*, e vírus do orthopox foram produzidos. O cDNA e a seqüência para as regiões variáveis do anticorpo de FMDV foram obtidos a partir do USDA. Os

5 cDNAs e as seqüências para os *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Brucélulaa* spp., o anticorpo das cepas 01 e 0139 de *Vibrio cholera* de regiões variáveis foram obtidos a partir dos investigadores em NMRC. As regiões variáveis dos anticorpos VEE e orthopox foram clonadas dos hibridomas

10 obtidos do CDC e do USAMRIID, respectivamente. O vírus da doença Febre Aftosa (FMDV), *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, e vírus Venezuelano da Encefalite Eqüina (VEE) são responsáveis para a doença Febre Aftosa, a Praga, tularemia, e a encefalite, respectivamente. A clonagem dos

15 hibridomas foi feita com uma combinação inicial descrita em diversos artigos publicados. As células emissoras específicas para o *Bacillus globigii* estão sendo produzidas porque esta bactéria não-patogênica é usada por algumas agências militares como um organismo de teste em

20 experiência de campo de sistemas de detecção de agente de guerra biológica. A FIGURA 5 inclui um gráfico linear que mostra a resposta da emissão do fóton quando diversos clones de células emissoras FMDV específicas foram contatadas com alvos vivos de FMDV. Em cada caso, as

25 células emissoras queimaram fótons dentro de aproximadamente 20-30 segundos após o contato entre o alvo e as células. São incluídos no gráfico os dados que mostram uma falta da emissão quando um mutante FMDV (tendo a única mutação do aminoácido na proteína viral de revestimento)

que não seria esperado que se ligasse à célula emissora foi contatado com um clone da célula emissora. O controle negativo suporta a especificidade elevada que é construída no sistema de detecção.

5           As várias configurações de um arranjo de tubo de centrífuga e de fotomultiplicador (PMT) podem ser incorporadas em um sistema da invenção. O arranjo inclui um rotor (motor) que gira um tubo de microcentrífuga da amostra a partir de um cabo de balanço e inclui um tubo do  
10           contrapeso em uma posição fixa. O PMT é mostrado no fundo, direcionando-se para cima para a extremidade inferior do tubo de amostra em repouso. Em uma experiência típica para uma partícula alvo que é menor do que a célula emissora, a amostra líquida de contenção é colocada no tubo de amostra  
15           e centrifugada sob as circunstâncias suficientes para sedimentar a maioria das partículas à parte inferior do tubo (por exemplo, 60 segundos no *Francisella tularensis* de 5600 x g). Uma suspensão de células emissoras então é mergulhada na amostra no tubo (de modo a não interromper as  
20           partículas sedimentadas) e girada momentaneamente para peletizar as células no contato com as partículas alvo. Caso as partículas alvo estejam presentes nas partículas candidata, os fótons de um comprimento de onda específico devem ser emitidos das células e ser capturados e  
25           registados pelo PMT.

          Em modalidades específicas, o PMT pode ser um Hamamatsu HC 125-08 PMT fazendo interface com os sistemas SR400 pesquisa Stanford - Dois Canais de Contador de fóton bloqueado. A centrífuga pode ser uma Sapphire de 17 voltas,

18.5 AWG, motor de 5 ampères que tem uma configuração de balde de vaivém.

O tubo de centrífuga (câmara da reação) pode ser alterado e aprimorado como necessário para auxiliar no contato entre partículas candidatas e células emissoras. Em uma modalidade mostrada na FIG. 20, o tubo contém um compartimento anexado que prende células emissoras pré-carregadas no fundo do tubo. Este compartimento é separado do descanso do tubo por uma membrana de anodo dissolvível em ouro. Na operação, as mesmas partículas candidatas são depositadas no tubo e sofrem rolamento para concentrar partículas candidatas na membrana. A membrana é dissolvida então, e o tubo é girado momentaneamente para contatar as partículas com as células emissoras. Este sistema dissolvível de membrana é descrito por Langer e por colegas in *Angewandte Chemie International Edition* 39:2396-2407, 2000; e *Nature* 397:335-338, 1999.

As etapas no processo de centrifugação podem ser automatizadas ou alternativamente projetadas de modo que o usuário não necessite parar a centrífuga de nenhuma maneira. Por exemplo, a introdução e a remoção dos líquidos e das amostras podem ser realizadas sem a necessidade de parar o rotor adaptando as características mecânicas de centrífugas preparadas (por exemplo, ultracentrífugas) disponível dos Instrumentos Beckman. Além disso, pode ser desejável detectar a emissão do fóton enquanto as forças centrípetas ainda estejam sendo aplicadas (por exemplo, quando o contato entre células emissoras e partículas alvo é instável sem centrifugação). Para detectar os fótons

emissores do tubo de amostra enquanto este está girando, o PMT pode ser arranjado em uma posição radial relativa ao eixo do rotor. Na maioria dos casos, o PMT neste arranjo não precisa girar junto com o tubo de amostra, mas preferivelmente pode ser estacionários e simplesmente de emissão de registo de fótons quando o tubo de amostra passa na frente do PMT. Caso o sinal de emissão seja muito fraco, então o detector (por exemplo, PMT, chip CCD) podem ser acoplados ao rotor e ser girados junto com o tubo de amostra. Alternativamente, PMTs múltiplo podem se pôr em torno de uma circunferência de um rotor para detectar emissões.

Caso as amostras múltiplas sejam giradas no mesmo rotor, o posicionamento ou o tratamento dos sinais do PMT podem ser alterados caso necessário. Em uma modalidade, o rotor acomoda 4 tubos de amostra, cada um contendo células que são emitidas no mesmo comprimento de onda. Para diferenciar as emissões que se originam de uma amostra sobre as emissões de outra, um único PMT radial alinhado pode detectar emissões continuamente. Os dados da emissão contínua são resolvidos então usando um traço do sincronismo do rotor, que monitora a posição de cada amostra sobre o tempo, para alocar as emissões a cada amostra. Outras variações são compreendidas como estando dentro da invenção.

Por exemplo, a FIGURA 17 é um desenho esquemático de dois tubos de reação acoplados a um rotor, com dois PMTs alinhados abaixo dos tubos. Em uma posição de descanso, o rotor posiciona cada um dos tubos abaixo do PMT

correspondente, usando o codificador da posição de rotor. Em um outro exemplo, o sistema de centrifugação que é mostrado na FIG. 17 pode ser integrado com um coletor de amostra de ar para conseguir o sistema mostrado na FIG. 18.

5 O tubo radial do projétil de aerossol pode incluir qualquer tipo de monitor de partícula, tal como descrito em Patente U.S. N° 5.932.795 e em referências mencionadas neste. Em ainda outro exemplo, o sistema descrito na FIGURA 18 pode ser alterado somente no caso de um PMT alinhado radial em

10 relação ao eixo do rotor ser exigido, como mostrado na FIGURA 19. Como discutido acima, as emissões registradas pelo PMT são determinadas como sendo cada tubo de amostra usando-se o codificador de eixo.

Referindo-se novamente à FIGURA 17, os componentes

15 fluidos que incluem, mas não se limitam a, suspensões de células B projetadas para reconhecer bioagentes específicos, soluções de tampão, conservantes, meio de cultura de célula, podem ser colocados em cada um dos diversos tubos de centrífuga, misturado com uma suspensão

20 líquida de partículas de amostra que seja coletada previamente das amostras de aerossol em partículas separadas de um processo não possa incluir, mas não estar limitado a, proteínas, peptídeos, produtos químicos, vírus, bactérias em forma vegetativa e de esporo, esporos de

25 fungo, grãos de pólen, protozoários, células derivadas de sangue ou tecido, e em fragmentos destes ou separados ou conjuntamente com partículas de carreador tais como a poeira. Quando o motor da rotação é ligado, os tubos de centrífuga balançam para fora em uma posição radial, e as

células B e/ou as partículas da amostra são conduzidas ao fundo dos tubos de centrífuga em taxas que dependem do tamanho e da densidade das partículas. A seqüência exata por meio da qual a célula e os líquidos da amostra de  
5 contenção são adicionados e centrifugados pode ser personalizada baseando-se em suas velocidades em relação à sedimentação para maximizar o sinal. Geralmente, espera-se que a saída máxima de fóton possa ser obtida das partículas que se sedimentam mais lentamente do que células B girando  
10 estas amostras (pré-giro) nos momentos apropriados que antecedem a adição de células B e girando para as deixar em contato. Para as partículas sedimentadas em taxas similares ou mais rápidas do que as células B, uma única rotação dos componentes misturados da amostra e da célula B iniciará a  
15 saída de fóton máximo de sistema. Os dados dos analisadores de tamanho de partícula (que incluem, mas não estão limitados às unidades de BAWs, e aos analisadores fluidos da partícula) incorporados à montante do dispositivo de centrifugação podem ser usados para determinar  
20 automaticamente a seqüência ótima da operação e para iniciar a manipulação automatizada controlada por computador apropriada da amostra.

Quando o "ciclo de rotação" é terminado e o rotor chega a uma parada controlada em uma posição predeterminada  
25 controlada pelo codificador de motor e de eixo de rotação, os braços do pêndulo giram sob a força da gravidade de modo que os fundos dos tubos de centrífuga sejam apresentados à superfície sensível dos tubos de fotomultiplicador, e todos os sinais de luz sejam gravados então. Em uma versão

modificada desta execução, um único tubo de fotomultiplicador pode ser posicionado no raio máximo da configuração do rotor/tubo e ser usado para coletar fóton de cada tubo enquanto passam pela superfície sensível do tubo de fotomultiplicador na sucessão. A saída do fóton medida a partir dos tubos individuais pode ser atribuída e combinada com base na monitoração do sistema de codificação do eixo.

Referindo-se novamente a FIGURA 18, o processo de coleta das partículas de aerossol é integrado com o processo de levar as partículas de aerossol ao contato com as células B. Aqui, os tubos de centrífuga são anexados aos braços do pêndulo que permitem que eles cubram as extremidades dos tubos radiais do projétil ao girar, e a amostra do aerossol é induzida para fluir na entrada da amostra pelas forças centrífugas que atuam no ar nos tubos radiais de rotação de projétil (pode ser auxiliado como necessário por unidades adicionais do ventilador). A alta velocidade das partículas do aerossol ocasiona a colisão de fluxo de partículas de aerossol na superfície interna do tubo de centrífuga ou na superfície de um líquido contido nos tubos e resultada na captação das partículas na superfície do tubo ou no líquido, respectivamente. Quando um líquido está presente, as pressões centrífugas que atuam no líquido equilibrarão a força dada pelo fluxo de ar de alta velocidade exigido para a captação da partícula no líquido e impedirão que seja fundida para fora pelo ar de colisão. As partículas de aerossol são retidas depois da colisão com a superfície ou o líquido do tubo e no caso da

coleta líquida, forçadas para fluir radialmente para fora desse modo fornecendo concentrações locais aumentadas da partícula no raio máximo (o fundo do tubo de centrifugação). Adicionando células B e girando-as na zona localmente concentrada de partícula depois da fase da coleta iniciará a saída do fóton. Alternativamente, as células B podem estar presentes no líquido durante a coleta e a saída de luz monitoradas em tempo real enquanto gira em um único tubo de fotomultiplicador (FIG. 19). Em uma versão modificada desta implementação, os componentes fluidos (que incluem, mas não estão limitados às amostras da partícula coletadas via um coletor alternativo de bioaerossol, e das suspensões de células B projetadas) poderiam ser adicionados às entradas, e às forças centrífugas que podem ser usadas para distribuí-los aos tubos.

Quando o "ciclo de rotação" é terminado e o rotor chega a uma parada controlada em uma posição predeterminada controlada pelo codificador do motor e de eixo da rotação, os braços do pêndulo giram sob a força da gravidade de modo que o fundo dos tubos de centrífuga seja apresentado à superfície sensível dos tubos do multiplicador de foto, e então todos os sinais de luz serão gravados. Em uma versão modificada desta modalidade, um único tubo de fotomultiplicador pode ser posicionado no raio máximo do rotor/tubo de configuração e usado para coletar fóton de cada tubo quando eles passam pela superfície sensível do tubo de fotomultiplicador em sucessão. A saída de fóton medida a partir dos tubos individuais pode ser atribuída

e combinada baseando-se na monitoração do sistema da codificação do eixo.

A FIGURA 7 é uma representação esquemática dos resultados de centrifugações seqüenciais. Para as partículas alvo menores do que as células emissoras, mas tendo a mesma densidade das células emissoras, é preferível que sejam primeiramente giradas as partículas candidatas (por exemplo, em alta velocidade) para peletizá-las. Depois disso, as células emissoras podem ser adicionadas e giradas sob as circunstâncias que podem ser mais moderadas na prevenção da redução de sua compreensibilidade como necessário (série superior). Além disso, esta seqüência de centrifugação força quase todas as partículas candidatas e células emissoras a terem um volume relativamente pequeno no fundo de um tubo de centrífuga. Ao contrário, misturar as partículas candidatas e as células emissoras junto e girá-las ao mesmo tempo conduzirão à separação ao invés do contato entre as partículas e as células emissoras (série média). Naturalmente, nenhuma rotação reduz dramaticamente de todo a concentração eficaz de partículas e de células emissoras na reação (série inferior).

A FIGURA 8 inclui gráfico linear que mostra em um experimento real a confirmação das conseqüências propostas na FIGURA 7. As células emissoras específicas para o *Francisella tularensis* foram misturadas com as células mortas de *Francisella tularensis* nos três métodos mostrados na FIGURA. 7. Como observado no gráfico linear, o método de rotação seqüencial resultou na emissão rápida e eficiente após o contato. Ao contrário, o perfil da emissão do único

método de rotação foi menos pronunciado tanto no sincronismo quanto na magnitude. O método de nenhum giro exibiu raramente uma reação.

Um perfil similar da emissão foi gerado em um experimento separado, como resumido no gráfico linear mostrado na FIGURA 8. A inspeção dos traços da emissão sugeriu que o único método de rotação conduziu às emissões alvo específicas um pouco mais rapidamente do que o método de dois giros. Entretanto, este resultado foi encontrado para ser primeiramente um produto manufaturado de rotação mais longa exigida para método de dois giros e não reflete uma melhoria real no momento de resposta das células B. De fato, a inclinação inicial do método de dois giros era significativamente maior do que aquela para o método de único giro, indicando que o método de dois foi conduzido a uma resposta robusta do emissor.

A sensibilidade de sistema de detecção mostrado na FIGURA 8 foi avaliada por titragem o número de células de tularemia depositadas no tubo de centrífuga. Os resultados estão resumidos no gráfico linear mostrado na FIGURA 10. Parece que 25.000 de células emissoras foram capazes de emitir os fótons detectáveis acima da base em resposta a aproximadamente 5.300 partículas alvo de tularemia. Espera-se que uma otimização adicional de condições de reação venha a aumentar a sensibilidade.

As respostas da célula são melhoradas após um único ciclo de congelamento-descongelamento (vide FIG. 22). Neste experimento, as células específicas para *Yersenia pestis* (YP) foram centrifugadas, ressuspensas em meio de

congelamento (RPMI com 10% DMSO e um adicional de 10% de FBS), congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , e transferidas para nitrogênio líquido. As células foram descongeladas a  $37^{\circ}\text{C}$  e as células de 1 ml ( $2 \times 10^6$ ) foram diluídas em 4 ml de RPMI e  
5 incubadas durante a noite a  $37^{\circ}\text{C}$ . No dia seguinte as células foram carregadas com o coelenterazina por 2 horas, lavadas em meio de  $\text{CO}_2$  de meio Independente ( $\text{CO}_2\text{-I}$ ) e recuperadas em 24 horas. 10.000 células foram administradas com  $5 \times 10^5$  P (50ul de YP em  $10^7/\text{ml}$ ). As células não  
10 tratadas indicaram uma resposta de 9500 fótons por segundo, enquanto as células descongeladas sendo congeladas emitiram aproximadamente 6 vezes mais fótons em resposta a YP. Este efeito estimulante poderia ser largamente replicado pela exposição das células ao meio de congelamento, sem o  
15 congelamento real (5 vezes a estimulação). Parece que o fator de estimulação no meio de congelamento é o DMSO. Quando as células foram tratadas com 2% DMSO (a concentração final de DMSO quando 1 ml das células no meio de congelamento que contém 10% DMSO é diluído em 4 ml de  
20 meio normal) um nível similar de estimulação foi detectado. O efeito de DMSO pode acontecer ser devido a um número de fatores. DMSO é conhecido para efetuar a diferenciação de célula hematopoética, e pode estimular as células através deste percurso. Adicionalmente, as células congeladas no  
25 meio que contém o glicerol igualmente mostram níveis similares de estimulação. Assim, parece que o efeito pode também em parte acontecer devido a uma resposta de estresse induzida pelo DMSO e pode ser possível replicar esta

estimulação usando alguns de um número de circunstâncias que estimulam uma resposta de "choque de calor".

As células podem ser armazenadas congeladas no estado carregado de coelenterazina. As células foram carregadas com  
5 coelenterazina, que as permitiu recuperarem-se por 24 horas, e então serem congeladas. Sob descongelamento as células foram lavadas com 10 ml de meio de CO<sub>2</sub>-I e as células foram ressuspensas em meio de CO<sub>2</sub>I a uma  
10 concentração de  $5 \times 10^5$  células/ml. Estas células foram capazes de detectar YP (neste caso aproximadamente 1 hora após descongelamento, mas alguns momentos mais curtos são possíveis). Estas células permaneceram capazes de detectar o agente por diversos dias quando armazenadas no RT. O pré-tratamento destas células com DMSO, antes do carregamento  
15 com coelenterazina e do congelamento, pode-se aumentar a sensibilidade das células ao agente após descongelamento.

Na FIGURA 22, as células foram administradas com o 50ul de 10.000.000 YP/ml diluído em CO<sub>2</sub>-I após vários tratamentos de célula. Não tratado: As células cresceram em  
20 RPMI, carregadas com coelenterazina, lavadas, recuperadas por 24 horas, e administradas com YP. Congelamento/descongelamento: As células cresceram em RPMI, foram transferidas para o meio de congelamento, e congeladas. As células descongeladas (1 ml) foram colocadas  
25 em 4 ml de RPMI e incubadas a 37°C por 24 horas, carregadas com o coelenterazina, lavadas, recuperadas por 24 horas, e administradas. Meio de congelamento: As células cresceram em RPMI, foram transferidas ao meio de congelamento e incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos. As células

(1 ml) foram colocadas em 4 ml de RPMI e incubadas a 37°C por 24 horas, carregadas com coelenterazina, lavadas, recuperadas por 24 horas, e administradas. 2% de DMSO: As células cresceram em RPMI, foram transferidas para RPMI contendo 2% DMSO e incubadas a 37° C por 24 horas, carregadas com coelenterazina, lavadas, recuperadas por 24 horas, e administradas.

Um sistema de detecção bem-sucedido de guerra biológica deve ser resistente à contaminação pelas substâncias ambientais comuns presentes em um campo de batalha. Para avaliar se as células emissoras podem agir sob estresse ambiental ou contaminação, as células emissoras foram misturadas com uma partícula alvo após a exposição das células emissoras a uma hora de exaustão diesel de intensidade máxima ( gráfico linear à esquerda na FIGURA 11), ou quando as células emissoras foram contaminadas por  $10^7$  *E. Coli* (gráfico linear à direita na FIGURA 11), que foram usados como um contaminador substituto para qualquer bactéria do campo. Segundo as indicações de FIG. 11, o produto químico e os contaminadores biológicos particulares testados não afetaram a habilidade de células emissoras de queimar os fótons em resposta a uma partícula alvo.

AS FIGURAS. 13-14 descrevem uma modalidade diferente da invenção que não exige a centrifugação. O diagrama esquemático da FIG. 13 mostra os vários componentes desta modalidade. Um sensor de alerta de aerossol biológico (BAWS) detecta as partículas presentes, por exemplo, dentro de uma escala predeterminada de tamanho. Um exemplo de um

BAWS é descrito em Primmerman, Lincoln Laboratory Journal 12:3-32, 2000. Caso as partículas que encontram especificações sejam detectadas, BAWS aciona um concentrador de ar-a-ar (coletor de espécime; como descrito em Patente U.S. N° 5.932.795) que permite que as partículas de uma escala particular de tamanho sejam coletadas e depositadas em um poço (câmara de reação) em uma parcela de uma faixa de espécime em uma primeira estação, que é mostrada em perspectivas diferentes na FIGURA 14. Depois que as partículas candidatas são depositadas no poço, a faixa avança para uma segunda estação sob um reservatório de células emissoras e sobre um PMT. As células emissoras específicas para um antígeno particular em partículas alvo são depositadas no poço, e a emissão de fóton do poço é monitorada.

Durante o tempo que as partículas candidatas são detectadas por BAWS, as partículas candidatas podem ser depositadas em poços consecutivos enquanto a fita está avançando através da primeira estação (FIG. 14). Na segunda estação, uma pluralidade de reservatórios da célula emissora, cada um contendo células emissoras que têm especificidades alvo diferentes, é montada em uma torreta que rode um reservatório particular em uma posição para depositar células emissoras diferentes dentro do poço. Desse modo, os alvos diferentes dentro das partículas candidatas podem ser detectados, como mostra a perspectiva superior esquemática dos poços na FIGURA 14. Naturalmente, caso as células emissoras diferentes sejam emitidas em comprimentos de onda diferentes, será possível depositar as

células emissoras diferentes em um único poço que contém partículas candidatas, contanto que o PMT abaixo da segunda estação pode distinguir fóton de comprimentos de onda diferentes.

5           A FIGURA 16 mostra esquematicamente, contudo, uma outra modalidade de um sistema da invenção. Nesta modalidade, as partículas de ar são depositadas em cada um dos seis poços dentro de uma fileira de um arranjo bidimensional (por exemplo, uma faixa que possui 6 fileiras  
10 e centenas de colunas) em uma primeira estação. Enquanto o arranjo está avançando por uma fileira, posicionando a fileira em uma segunda estação, as células emissoras diferentes são depositadas dentro de cada um dos poços no interior da fileira, e a emissão de todas as seis reações é  
15 detectada simultaneamente por uma fileira PMTs sob a segunda estação. Para auxiliar a adesão das partículas aos poços na faixa, os poços podem ser revestidos com um adesivo ou um líquido.

#### **EXEMPLIFICAÇÕES PARTICULARES**

20           *Métodos e Materiais*

##### *Cultura de Célula e Transfecção*

As células de M12g3R foram mantidas a 37°C em uma atmosfera umedecida de 5% CO<sub>2</sub> em RPMI 1640 suplementado com o soro fetal bovino a 10%, 1mM de piruvato de sódio, 2mM de  
25 L-glutamina, 100µM de aminoácidos do nonessencial, 50µM de 2-mercaptoetanol, 50 µg/ml de estreptomicina, e 50-U/mL de penicilina (Tecnologias de Vida). As células transfectadas com pCMV.AEQ.IRES.NEO [11] (20µg de DNA por 10<sup>7</sup> células) via eletroporação (270 V, 950µF) e foram selecionadas em

1mg/mL G418 por 2 semanas. As células resistentes aos antibióticos foram incubadas no meio de crescimento com coelenterazina de 10  $\mu$ M (sondas moleculares) por 2 horas na temperatura ambiente, cobertas em folha metálica, lavadas 5 duas vezes e ressuspensas no meio de crescimento. As células foram selecionadas para a emissão de fóton em resposta a IgM anti-murino F (ab')<sub>2</sub> em um luminômetro.

As células U937 foram mantidas em RPMI 1640 suplementadas com o soro fetal bovino a 10%. No dia 10 anterior as células de transfecção foram diluídas a 5 x 10<sup>6</sup>/mL. No dia seguinte as células U937 foram lavadas uma vez em HBSS e ressuspensas em 900 $\mu$ l de HBSS. Vinte microgramas de pCMV.AEQ.IRES.NEO tornado linear foram adicionados às células e permitidos incubar por 10 minutos 15 à temperatura ambiente. A mistura então foi transferida para um cadinho de eletroporação (0.4cm) e foi electroporada em 250 V e 975 $\mu$ F. As células foram incubadas no meio de crescimento a 37°C por 48 horas, a seguir clonadas no meio que contém 5 $\mu$ g/ml de Blasticidin limitando 20 a diluição em 96 placas de poço. Após 10-14 dias as colônias foram selecionadas e cresceram acima para a separação. Os clones foram carregados com coelenterazina e foram separados para responder ao ionomicin de 5mM. Os clones positivos foram adicionalmente expandidos e 25 caracterizados.

#### *Vetores de Expressão de Anticorpo*

O vetor de expressão de cadeia de luz, VKExpress, contém a região constante para o gene humano kappa à jusante de um local de clonagem múltipla (MCS), sob o

controle de promotor humano de fator  $1\alpha$  de alongamento (EF- $1\alpha$ ).

O vetor de cadeia pesada foi gerado pela modificação de pDisplay (Invitrogen), retendo o promotor citomegalovírus (CMV) e a seqüência líder, mas substituindo o domínio de transmembrana de receptor de fator de crescimento derivado de plaqueta com o gene para ligação de membrana da região constante de murino IgM e removendo ambas as identificadors sobre cada lado do MCS. A seqüência genômica da ligação de membrana da região constante do murino IgM, CpM, foi amplificada pelo PCR usando os iniciadors que contiveram EcoR I e Not I (5' e 3' , respectivamente). A inserção, preparada em um local de EcoR I moderado e absorvida por Not I, foi clonada dentro do higro-pDisplay com Bsm I moderado e absorvido por Not I. O gene resistente a neomicina foi substituído por um que confere resistência a higromicina (hygro®, obtido a partir de pcDNA3.1 Higro, Invitrogen) por adição de Cla I e BstB I em locais restritos às extremidades 5' e 3' do gene hygro®, respectivamente, pelo PCR, e pela clonagem do novo gene resistente a antibiótico dentro daqueles sites de pDisplay. Os sites de restrição apropriados são adicionados às regiões variáveis do anticorpo usando-se o PCR, e a seqüência de todos os produtos PCR serão confirmada antes da clonagem dentro do constructo de expressão.

#### *Clonando Genes de Anticorpos*

O RNA foi extraído com reagente de Trizol (tecnologias da Vida), de acordo com as recomendações do fabricante, e a primeira síntese da cadeia foi executada usando-se o kit

Retroscrip (Ambion). O PCR foi executado pela utilização de conjuntos de primers projetados para reconhecer as seqüências líder ou as regiões da estrutura na extremidade 5', e as regiões da constante ou da estrutura na extremidade 3'. A clonagem das regiões variáveis dentro dos vetores de expressão prosseguiu como a seguir. Sites de restrição ApaI e BamHI foram adicionados às extremidades 5' e 3' das regiões variáveis de cadeia luz pelo PCR com as iniciadores que contêm estas seqüências, e clonados em VKExpress. As regiões variáveis da cadeia pesada ( $V_H$ ) foram clonadas dentro do pDisplay-C $\mu$ M em um processo de duas etapas para eliminar os identificadores do HA e do myc. Primeiramente, o PCR de extensão de sobreposição foi usado para fundir o  $V_H$  aos primeiros 300 pares base (bp) de C $\mu$ M, enquanto, ao mesmo tempo, é adicionado um site de restrição Bgl II à extremidade 5'. A inserção foi absorvida por Bgl II, que igualmente se dilui em bp 293 da região constante, e foi clonada dentro do pDis-C $\mu$ M absorvido com a mesma enzima. Um segundo produto de extensão de sobreposição fundiu o  $V_H$  à seqüência líder Igk, que foi clonada ao usar os sites Kpn I e de Bgl II.

Modificou-se subseqüentemente este processo de clonagem produzindo um vetor pDisplay-C $\mu$ M com um site Bgl II imediatamente depois do líder para permitir que uma única etapa de clonagem elimine ambos os tag.

#### **Ensaio de CANARY**

As células B foram preparadas para o ensaio de luminescência pela incubação no meio de crescimento com a adição de 2% DMSO em uma concentração de  $5 \times 10^5$

células/mL. Após 20-24 horas, as células foram incubadas no escuro à temperatura ambiente por 2 horas em meio de ensaio [meio Independente de CO<sub>2</sub>, soro fetal bovino a 10%, 50µg/ml de streptomicina, 50-U/ml de penicilina, e 250 ng/mL de amfotericin B (vida Tecnologias)] com 50 µM de coelenterazina (sondas moleculares, Eugene, OR). As células foram lavadas então duas vezes, ressuspensas em meio de ensaio em uma concentração final de 5 x 10<sup>5</sup> células/mL nos tubos de microcentrífuga 1.5-mL, e foram deixadas rodar durante a noite à temperatura ambiente.

As amostras de teste foram diluídas no meio de ensaio e centrifugadas em tubos de 0.2-mL ou 1.5-mL por 2 minutos no balde de vaivém ou na centrífuga horizontal na velocidade máxima. As células B foram misturadas cuidadosamente pela inversão e 20µl de células foram depositadas no lado do tubo de amostra. O tubo de amostra foi centrifugado por 4 segundos em uma microcentrífuga pequena benchtop (Daigger) adaptada com um rotor horizontal feito sob medida, a seguir inserido no luminômetro (Zylux, FB 12). As respostas foram gravadas usando-se o perfil Cinético Único ajustado para intervalos de 1 segundo em um total de 60 segundos. As positivas foram definidas como tendo uma razão sinal/antecedente  $\geq 3$  e uma saída máxima de fóton dentro da escala de 15-30 segundos a partir do começo da centrifugação de 4 segundos.

As células U937 (5 x 10<sup>5</sup> células/ml) foram incubadas durante a noite com gama IFN (200 ng/mL, Sigma) a 37°C. No próximo dia, 7.5 x 10<sup>5</sup> células foram incubadas por 2 horas em 100µl do meio de ensaio que contém 200µM de

coelenterazina à temperatura ambiente no escuro, lavadas três vezes no meio de ensaio, ressuspensas em  $5 \times 10^5$  células/mL, transferidas para tubos de 1.5ml, e rodadas durante a noite à temperatura ambiente. As células foram incubadas com anticorpo (10-100 µg/mL de purificado, ou uma razão 1:1 de sobrenadante de hibridoma para células) por 5-30 minutos a 37°C, a seguir lavadas uma vez e ressuspensas em meio de ensaio. O ensaio foi realizado como descrito acima.

10 *Constructo de Expressão EGFP-Aequorin*

Para fundir aequorin a GFP gerou-se um constructo que contém o gene aprimorado de GFP (EGFP) fundido a uma ligação de 6 aminoácidos (SGGGSG), seguido pelo gene aequorin. EGFP foi amplificado por PCR a partir do vetor pEGFP-C1 (BD Biosciences Clontech), removendo o códon de terminação e adicionando a região de ligação para a extremidade 3' do gene:

Sense de Iniciador:

5' - GCCACCATGGTGAGCAAGGGC-S' (SEQ ID NO: 12)

20 Anti-sense de Iniciador:

5'-CCTGATCCACCGCCAGACTTGACAGCTCGTCC-S' (SEQ ID NO: 15).

EGFP contém uma substituição do duplo aminoácido (F64L e S65T) e mostra a intensidade realçada de fluorescência comparada a GFP. O gene aequorin foi amplificado a partir do constructo Aequorin pCMV, adicionando a região de ligação (linker) à extremidade 5' de gene: Sense de Iniciador:

5' - CTGGCGGTGGATCAGGAATGACCAGCGAACAATA-S ' (SEQ ID NO: 22);

Anti-sense de Iniciador:

5' - TTAGGGGACAGCTCCA-S ' (SEQ ID NO. 19).

5 Os genes EGFP e aequorin foram a seguir ligados juntos pelo PCR de extensão de sobreposição com o serviço de região de ligação (linker) como a região de sobreposição. Os genes fundidos foram clonados então em pCDNA3.1-TOPO (Invitrogen) e a seqüência foi confirmada.

#### 10 *Ensaio para Amostras Clínicas*

As secreções nasais foram coletadas usando-se os chumaços tipo espuma (Chumaços Críticos de VWR) a seguir foram semeadas com a quantidade indicada de esporos de *B. anthracis* e colocadas em um cesto que contém um filtro de 15 5µm (Millipore Ultrafree-MC) com 400µL de meio de ensaio. O eluato foi coletado em um tubo de microcentrífuga de 1.5mL com uma centrifugação de 2 minutos, uma etapa que igualmente serviria para concentrar os esporos no fundo do tubo. Após a centrifugação, o cesto e o chumaço são 20 removidos e o ensaio é realizado no mesmo tubo.

A urina humana (3mL), na qual *C. trachomatis* EBs ( $10^2$ - $10^5$ /mL, Biodesign International) foi adicionado, passou através de um filtro de seringa de 5µm (Minisart). As porcentagens de meio mililitro foram centrifugadas por 2 25 minutos em um tubo de microcentrífuga de 1.5-mL em 10.000 RCF, o sobrenadante foi decantado e o resíduo permitiu a absorção de material de longe colocando a borda do tubo contra a uma toalha de papel limpa. O pélete foi ressuspenso por realizar vórtice em 0.5 mL de meio de

ensaio adicionados, e a amostra foi centrifugada outra vez por 2 minutos em 10.000 RCF. O ensaio de CANARY foi realizado como descrito acima.

Meio mililitro de todo o sangue foi coletado dentro de um tubo heparinizado de separação de plasma feito sob medida e centrifugado por 90 segundos em 3500 RCF. O plasma contendo patógeno, com os volumes recuperados que variam de 50 a 250µL, foi coletado em um tubo de ensaio por inversão. Cinquenta microlitros de plasma foram misturados com os 0.5 mL do meio de ensaio e foram tratados como descrito acima em ensaio de CANARY. Para diluir o activador presente no plasma humano, 450µL foram adicionados ao plasma de 50µl. Para remover o ativador por adsorção, 50µl de plasma foram incubados com 50µL ( $2 \times 10^5$  células) de linhagens celulares B parentais, M12g3R, por 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram sedimentadas por centrifugação a 1500 RCF por 1 minuto para peletizar as células, o plasma foi transferido para um tubo limpo e centrifugado na velocidade máxima por 2 minutos.

Para construir o dispositivo para patógenos intracelulares do sangue, 200µL de solução de FICOLL™ HYPAQUE™ são colocados no fundo de um tubo de coleta de sangue Capiject (T-M, Terumo Médico Corp.). O gel de poliéster de um CPT (Becton Dickinson Co.) é colocado sobre o topo do FICOLL. Para que a separação apropriada das células sanguíneas ocorra no sangue inteiro devendo ser diluído pelo menos 6:1 de tampão fosfato salino (PBS); conseqüentemente 100µL de PBS são colocados sobre o gel. Todo sangue heparinizado (600µL) é colocado no tubo, o tubo

é invertido para misturar o sangue com o PBS e o dispositivo é centrifugado por 90 segundos a 3500 RCF. O vermelho obstruem a parte superior do dispositivo são substituídos dentro com um tubo de ensaio e os glóbulos do plasma e os brancos são coletados no tubo de ensaio pela inversão. A liberação dos patógenos intracelulares é conseguida adicionando-se 600µL M por o reagente de célula dissolvida (Pierce Biotechnology, Inc.) ao tubo de ensaio e incubando o mesmo à temperatura ambiente por 5 minutos com vórtice periódico. A amostra é centrifugada a 18.000 RCF por 1 minuto, o sobrenadante substituído por 500µL de meio de ensaio, misturado por realização de vórtice, e pela centrifugação repetida. A amostra é analisada pela presença de patógeno como descrito acima.

#### 15 *Validação do Chlamydia*

Os seguintes organismos foram testados por reatividade cruzada com a linhagem celular *C. trachomatis*: *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Branhamella catarrhalis*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia Coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Corynebacterium minutissimum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus saprophytics*, *Streptococcus grupo D*, *Streptococcus mutans*, *Gardereella vaginalis*, *Gemella morbillorium*. Sorotipos de *C. trachomatis* foram obtidos do Biodesign International.

#### *Fundo*

A CANARY utiliza as células B que foram planejadas geneticamente para produzir o aequorin, uma proteína bioluminescente sensível a cálcio originalmente encontrada nas águas-vivas de *Aequorea victoria*. O sistema funciona como se segue: (1) células B podem ser expostas aos bioagentes suspeitos ou aos outros patógenos de uma amostra de ar, da amostra de sangue, ou de outra fonte. (2) células B têm os anticorpos específicos para determinados bioagentes. Caso um daqueles agentes esteja presente na amostra, se ligará aos anticorpos na superfície da célula B. (3) Reticulação de anticorpos de uma célula B por um bioagente acionado por uma cascata enzimática intracelular que libera o cálcio de dentro da célula. (4) Na presença do cálcio, o aequorin emite a luz azul esverdeado em 469 nm. (5) Luz proveniente de células B estimuladas pode ser detectada usando-se um tubo de fotomultiplicador ou outro fotodetector.

Planejou-se geneticamente as linhagens celulares B que expressam ambos os (1) anticorpos específicos para os patógenos bacterianos e virais, e (2) a proteína aequorin. Aequorin funcional consiste no apoaequorin de proteína e seu substrato, coelenterazina, que é um produto químico que pode espontaneamente cruzar a membrana de célula e ligar-se ao apoaequorin. Após íons de cálcio de ligação, aequorin submete-se a uma mudança ajustável que causa a oxidação de coelenterazina e a emissão de luz. Células B contendo aequorin ativada, produziram antígenos específicos pela transfecção com vetores de expressão de DNA para anticorpos de recombinação, emitindo luz quando expostas ao antígeno

polivalente. Quando incorporadas em um formato apropriado de sensor, estas células podem ser um tremendo benefício para os diagnósticos médicos, à detecção de agentes de guerra biológica, e à monitoração da qualidade do alimento, da água, e do ar.

O sistema de detecção de célula B é intrinsecamente tão rápido (identificação em < 1 segundo) que o retardo primário no ensaio é o tempo necessário para levar os patógenos a terem contato com as células B. Este problema não é trivial, como nos patógenos e células B são partículas viscoelásticas microscópicas essenciais que tendem a deslizar um pelos outros em um ambiente fluido. Resolveu-se esse problema da bactéria e vírus grandes pela utilização da força centrífuga para conduzir junto as partículas. Quando o agente e as células B são colocadas simplesmente juntas na suspensão, a resposta de sinal é retardada na hora apropriada e baixa em magnitude. Quando o agente e as células B são peletizados por uma rotação de 5 segundos, tanto a velocidade quanto a magnitude da resposta melhoram. Entretanto, a grande melhoria na velocidade e na magnitude ocorre quando o agente é pré-peletizado, antes da adição das células B. As células B são conduzidas então ao pélete por uma rotação adicional de 5 segundos.

Os dados foram obtidos para os patógenos bacterianos *Francisella tularensis* e *Yersinia pestis* usando este formato centrífugo. Estes dados demonstram coletivamente a especificidade excelente assim como a melhor combinação da velocidade e da sensibilidade (50cfu em aproximadamente 3

minutos) dentre qualquer método conhecido da identificação do patógeno.

Para vírus maiores tais como a varíola, que pode ser sedimentado rapidamente em baixas velocidades, o método atual da centrifugação funciona bem. Entretanto, planejou-se igualmente a linhagem celular para produzir os anticorpos específicos para vírus tais como FMD, Dengue, e VEE, que são demasiadamente pequenos estiverem concentrados sob as mesmas circunstâncias. Embora o LOD para vírus pequenos seja aproximadamente 500.000cfu em um 1 minuto no ensaio , esse número pode ser melhorado para em torno de 100 vezes com purificação de afinidade ou centrifugação mais longa.

*Sensor de Célula B CANARY para a Identificação Rápida, Sensível de Patógenos em Amostra Clínica*

#### *Introdução*

Descreveu-se um sensor novo que fornece a melhor combinação de velocidade e de sensibilidade, contudo, demonstrado para qualquer técnica de identificação de patógeno. A abordagem usa os linfócitos B, os membros do sistema imunológico que foram otimizados pela natureza para identificar os patógenos. Planejou-se linhagens celulares B para expressar aequorin citosólico, uma proteína bioluminescente sensível a cálcio, assim como membrana ligada aos anticorpos específicos para os patógenos de interesse. A reticulação transversal de membrana ligada a anticorpos por um antígeno polivalente induz uma cascata de transdução de sinal que envolve seqüencialmente quinase tirosina, fosfolipase C, e trifosfato de inositol (IP3).

IP3 ativa os canais do cálcio, aumentando desse modo o cálcio citosólico dos armazenamentos internos e do meio extracelular, que ativa aequorin, o qual emite a luz. Este sensor, que chama-se CANARY, pode detectar <50 cfu de patógeno em <30 minutos, incluindo o tempo requerido para se concentrar as amostras. De forma contrária, mesmo o estado da técnica de imunoenaios tomando pelo menos 15 minutos e tendo um limite bem maior de detecção e enquanto o PCR pode ser tanto altamente específico quanto sensível, a maioria dos relatórios citam protocolos que tomam <30 minutos. Embora um PCR ultrarápido com detecção de 5 cfu em somente 9 minutos seja relatado, mesmo quando acoplado com a tecnologia de amostra de preparação mais rápida o ensaio total exige 20-30 minutos para terminar. Por causa de sua combinação original de velocidade e sensibilidade, a CANARY pode revolucionar a identificação do patógeno em diagnósticos médicos, defesa da guerra biológica, monitoramento de alimento e qualidade da água, e outras aplicações.

Desenvolveu-se primeiramente um sistema da engenharia genética que permitisse a produção eficiente de uma variedade de linhagens celulares B. Gerou-se uma linhagem celular parental com expressão estável de aequorin citosólico de linhagem celular B de M12g3R (IgM+), selecionando o clone com a emissão máxima de luz sob reticulação de IgM de superfície. As células de aequorin M12g3R transfectadas subsequentemente com os plasmídeos que contêm anticorpo de regiões constantes de luz e cadeia pesada, em que introduziu-se as regiões variáveis

específicas para um alvo particular. Os clones de segunda transfecção são selecionados com base em sua resposta a esse alvo. A fim prover uma idéia da escala dos agentes que podem ser identificados usando CANARY, foram listadas todas as 24 linhagens celulares que foram desenvolvidas na tabela abaixo.

*Alvos detectáveis para linhagem Celular CANARY*

Bacillus anthracis Esporos	Esporos de Bacillus subtilis	Potivírus Phytophthora spp.
Bacillus anthracis Vegetativo	Salmonella spp. Shigella dysenteriae	Febre Rift Valley Vírus
Francisella tularensis	E. coli O157:H7 Vírus FMD	Listeria spp. Listeria
Yersinia pestis	Vírus de Dengue	Monocitogenes
Vibrio cholerae O139	Orthopoxvírus	Vírus VEE
Vibrio cholerae O1	(Varíola)	Ovalbumin
Brucella spp.	Ralstonia spp.	Toxina Botulinum
Clamidia spp.		

*Resultados*

*O Ensaio de CANARY*

10 Tão pouco quanto 50 cfu de *Yersinia pestis*, a bactéria que causa a praga, é detectada em menos de 3 minutos do tempo total mínimo do ensaio. Entretanto, não há nenhuma resposta a um número relativamente grande de um patógeno não relacionado, *Francisella tularensis*. Além disso, mesmo  
15 uma quantidade impressionante de patógeno não relacionado não obstrui a resposta a não menos do que 50cfu de *Y. pestis*. De facto, para a maioria das bactérias ou dos vírus grandes o bastante para serem concentrados em uma

microcentrífuga, observou-se níveis similares de sensibilidade de 50cfu ~50 ou pfu. Quando a sensibilidade da linhagem celular de *Y. pestis* específica foi testada repetidamente sobre diversos meses, o sensor CANARY pôde  
5 detectar 20cfu em 62% do tempo (n=73), 50cfu em 79% do tempo (n=38), 200 (n=74) e 2000cfu (n=71) em 99% do tempo, e 20.000cfu em 100% do tempo (n=66). Uma taxa positiva falsa de somente 0.4% (n=1288), combinada com um nível de sensibilidade que se aproxima daquele do PCR e de um ensaio  
10 que pode ser executado em menos de 3 minutos, faz da CANARY uma das tecnologias de identificação de patógeno mais promissoras atualmente em desenvolvimento.

Pelo motivo da taxa de difusão determinar as interações entre células B e alvos não sedimentáveis, a  
15 sensibilidade da CANARY para vírus pequenos é mais elevada do que aquela para as bactérias e vírus grandes. Por exemplo, linhagens celulares B específicas para a cepa A12 do vírus da doença febre aftosa (FMDV) produz um sinal facilmente distinguível quando exposto a  $7 \times 10^5$  unidades  
20 de formação de plaqueta (pfu). Similarmente, a sensibilidade da linhagem celular B específica para o vírus Venezuelano de Encefalite Equina (VEE), testado com cepa TC-83 que sofreu titulação antes da não ativação, demonstra um sinal detectável de  $5 \times 10^5$  pfu.

25 A especificidade de CANARY é determinada pelo anticorpo das células B expressas, e pode ser tão larga ou estreita quanto os anticorpos que estão disponíveis. Por exemplo, quando a linhagem celular de FMDV responder ao tipo selvagem de vírus A12, nenhuma luz é detectada depois

que a adição de uma quantidade equivalente da cepa variante de A12 (B2PD.3) que difere de três aminoácidos, uma mudança que interrompe a interação de epítipo de anticorpo. Em contraste com a especificidade das linhagens celulares de FMDV, que reagem a somente uma cepa de FMDV, a linhagem celular B VEE exibe a especificidade similar àquela do anticorpo monoclonal de origem, reagindo com as cepas VEE que representam os subtipos IA (TC-83, TRD), IB (PTF-39), IC (P676), ID (3880), e IE (Mena II). A linhagem parental M12g3R (células B de Controle) foi testada igualmente para a reatividade com as cepas diferentes de VEE, e embora exibam um sinal não específico na presença de preparações de antígeno TC-83 e TRD (aqueles isolados no cérebro do camundongo recém-nascido, mas não na cultura do tecido), o sinal produzido pela linhagem celular B específica é claramente distinguível daquela do controle (> 10 vezes). Produziu-se igualmente uma linhagem celular B VEE do hibridoma 1 A4D-1, que reconhece tudo à exceção da cepa Mena II listada acima. Conseqüentemente, dados anticorpos monoclonais apropriados, a especificidade das linhagens celulares B pode ser projetada par ter uma escala larga ou estreita de reatividade baseada nos anticorpos que escolheu-se expressar. Isto aumenta extremamente a flexibilidade do sistema projetando este para distinguir organismos nos níveis do gênero, da espécie, ou das subespécies, dependendo da aplicação.

#### *Melhoria de Sensibilidade para vírus pequenos*

Diversos métodos de concentração e de sedimentação de vírus pequenos foram testados para que sua habilidade

melhore as respostas CANARY a estes agentes. A precipitação com metanol, TCA, ou fosfotungstato de sódio não melhorou a sensibilidade, nem fez a absorção à nitrocelulose. Os concentradores centrífugos dos vários cedentes pareciam se  
5 ligar não especificamente às baixas concentrações de vírus usadas dentro de Ensaio de CANARY. Dois métodos até aqui mostraram bons resultados: purificação da centrifugação e da afinidade.

O VEE TC-83 Inativo foi usado por todos os  
10 experimentos de concentração de vírus. Para gerar amostras fisiologicamente relevantes do vírus, os agregados de VEE foram removidos pela passagem através de 0,1 µm de filtros de seringa. As amostras então foram centrifugadas em momentos diferentes e analisadas por CANARY. A  
15 centrifugação por 1 minuto de vírus pequeno sedimentado, por 5 minutos deu resultados intermediários, e a sedimentação aproximou da conclusão em 10-30 minutos. Este teste padrão estava concordando bastante com as taxas de sedimentação teóricas para o VEE monomérico, indicando que  
20 produziu-se uma amostra de teste com características similares de sedimentação para àquelas esperadas por amostras reais. Isto igualmente demonstra que a centrifugação de VEE monomérico por 10-30 minutos em uma microcentrífuga aumenta o sinal, e conseqüentemente a  
25 sensibilidade.

Experimentos adicionais verificaram sonicação do material agregado para melhorar a recuperação monomérica do vírus. O LOD foi melhorado nas amostras sonicadas (~500.000pfu\*) comparadas às amostras não tratadas

(~50.000.000pfu\*), que refletem um aumento na quantidade de vírus monomérico presente e capazes de passar através de 0.1 µm de filtro. A amostra que que sofreu sonicação antes da filtração produziu quase 100 vezes mais sinais do que a amostra que não sofreu sonicação. A taxa de sedimentação do vírus monomérico produzido usando a sonicação é igualmente similar às taxas de sedimentação teóricas, indicando que a sonicação não fragmentou o vírus a uma extensão detectável nestes ensaios. A centrifugação pode melhorar a sensibilidade para um fator 100.

Um segundo método eficaz para melhorar a sensibilidade CANARY aos vírus pequenos é purificação de afinidade. Os anticorpos monoclonais contra o VEE foram conjugados às microesferas magnéticas G-revestidas da proteína. Esta resina de afinidade foi incubada então com os meios que contêm o VEE, a resina foi lavada para se remover o vírus não ligado, e as células de CANARY usadas para detectar o vírus unido à resina sedimentada. A incubação de VEE com estas resinas de afinidade para o tão pouco quanto 15 minutos aumentaram claramente a amplitude de resposta da célula de CANARY, e melhoraram o LOD para um fator 10.

Tanto os métodos de purificação de afinidade e de centrifugação conduzem às respostas CANARY ao vírus pequeno melhoradas. O método escolhido dependerá do tipo de amostra a ser examinada. As amostras que contêm interferentes sedimentáveis ou solúveis podem ser favoráveis à purificação de afinidade dos agentes que usam microesferas magnéticos. As amostras que contêm interferentes solúveis

ou que carecem de interferentes completamente podem ser analisadas usando-se protocolos de centrifugação.

*Engenharia de Célula Rápida*

A geração de células de CANARY patógeno específicas exige uma linhagem celular disponível de hybridoma, envolvendo diversas etapas, e pode levar diversos meses. Há uma necessidade de desenvolver uma linhagem celular universal que possa ser usada para gerar células específicas do patógeno novo de uma maneira rápida (< 1 dia), mas específica, utilizando a plataforma CANARY. Para endereçar esse ensaio, exploramos a utilização do receptor Fc como uma possível molécula de "adaptador" para anexar-se aos anticorpos de patógeno específico. Os receptores Fc são uma família de proteínas membranas expressadas que ligam aos anticorpos ou aos complexos imunes. Estes são expressos em diversas células hematopoiéticas que incluem monócitos e macrófagos. Diversas subclasses de receptores Fc existem incluindo o receptor de Fc $\gamma$  I (Fc $\gamma$ RI), uma ligação de alta afinidade de anticorpo solúvel. Fc $\gamma$ RI liga-se à região constante (porção de Fc) da imunoglobulina G (IgG) que sai da região de antígeno de ligação de anticorpo livre. A reticulação do anticorpo ligado a receptor por antígenos específicos inicia um percurso de sinalização que estimula a liberação de cálcio.

A linhagem celular de macrófago humano, U937, contém FC $\gamma$ R1 endógeno que pode sofrer regulação de expressão gênica sob tratamento com IFN $\gamma$ . As experiências iniciais demonstram que as células U937 podem ser projetadas rapidamente para responder a diversos patógenos ou

semelhantes diferentes. As células U937 foram tratadas por 24 horas com IFN $\gamma$  (200 ng/ml) para aumentar a expressão de Fc $\gamma$ RI endógeno, e preparadas para o ensaio de CANARY. As células foram incubadas então com os seguintes anticorpos:

5 espora anti-B *anthracis* de camundongo, espora anti-B *anthracis* policlonal de coelho, anti *F. tularensis* de camundongo, ou anti-B. *subtilis* de camundongo. As células foram usadas então no ensaio de CANARY padrão onde detectaram não menos do que os esporos *B. anthracis* de

10 1000cfu com o anticorpo monoclonal e os esporos com o coelho monoclonal de 10.000cfu, assim como esporos *F. tularensis* de 10.000cfu e esporos *B. subtilis* de 1.000cfu. Embora não tão sensível quanto as células B geneticamente planejadas, foi demonstrado o desenvolvimento de uma célula

15 de CANARY rapidamente planejada que exige dias em vez de meses.

#### *Ensaio Multiplexados*

Avaliou-se a probabilidade de se combinar diversas linhagens de célula B diferentes em um único ensaio. Isto

20 permitiria a detecção de diversos agentes com um único teste, embora não fosse possível distinguir que agente está na amostra. A detecção de 3 agentes diferentes com um único reagente da célula foi demonstrada onde o limite de detecção para *B. anthracis* era de 50cfu de B.A., *Y. pestis* era de

25 50cfu de Y.p., e *F. tularensis* era de 50cfu de F.t. Em uma concentração e quantidade celular otimizadas de 40 $\mu$ L de  $1.25 \times 10^5$  células/mL, pode-se mostrar que 4 linhagens celulares podem ser combinadas sem nenhuma perda na sensibilidade.

Um segundo método da multiplexação são as linhagens celulares que expressam mais de um anticorpo e podem responder a mais de um agente. Gerou-se uma linhagem celular que expressa dois anticorpos, um específico para os esporos de *B. anthracis* e o outro para *Y. pestis*. Esta  
5 linhagem celular foi usada para detectar somente 50cfu de esporos de *B. anthracis* ou *Y. pestis*, demonstrando que pode-se criar uma linhagem celular com as capacidades múltiplas de detecção sem nenhuma perda na sensibilidade.

10 Um terceiro método que provê um ensaio multiplexado são as linhagens celulares CANARY que emitem luz de comprimentos de onda diferentes. O aequorin de água-viva (*Aequorea Victoria*) é associado naturalmente com a proteína fluorescente verde (GFP). Quando aequorin se liga ao cálcio  
15 e oxida coelenterazina esta transfere sua energia a GFP e estimula a emissão de luz verde ( $\lambda_{max}$ , 509 nanômetro). Esta atividade natural de transferência de energia ressonante de quimioluminescência (CRET) pode ser reproduzida *in vitro* por fusão da proteína aequorin a GFP. GFP pode ser  
20 geneticamente modificado para produzir as várias proteínas fluorescentes que incluem a proteína fluorescente ciano e a proteína fluorescente amarela. A fusão de aequorin aos diferentes constructos de GFP pode gerar diversas proteínas de aequorin capazes de produzir luz de comprimentos de onda  
25 diferentes. As células de CANARY que expressam estas proteínas de aequorin-GFP provêem um ensaio multiplexado, onde a detecção de alguns ou vários comprimentos de onda permita a identificação de diversos patógenos em um único ensaio. Este tipo de ensaio multiplexado tem diversas

vantagens, incluindo a identificação de diversos patógenos em um único ensaio quando o tamanho de amostra é limitado, a habilidade testar ao mesmo tempo múltiplos patógenos quando se usa um sensor de canal único, e o potencial para 5 diminuição de taxas positivas falsas nos sensores de multicanal aumentando o número de réplicas.

O constructo de EGFP-aequorin foi transfectado dentro de células B murino de M12g3R e os clones foram selecionados pela resposta à estimulação anti-IgM. Os 10 clones positivos foram analisados em um citômetro de fluxo onde as células que expressam EGFP ( $\lambda_{max}$ , 509 nm) pudessem ser detectadas no canal FL1, que mede a luz no espectro verde a partir de 515 a 545 nm. A fim de demonstrar adicionalmente que as células que expressam EGFP aequorin 15 estão emitindo um comprimento de onda diferente de luz do que aquelas que expressam aequorin tipo selvagem, analisou-se a saída de luz com os dois tubos de fotomultiplicadores (PMTs) com filtros passa-banda diferentes, 480 nm e 510 nm. As células foram estimuladas com anti-IgM, e a luz foi 20 medida simultaneamente por ambos os PMTs. Por causa dos espectros de emissão de aequorin e da sobreposição de EGFP-aequorin, os resultados são expressos como a razão luz verde/azul. A quantidade de luz verde emitida pelas células que expressam EGFP-aequorin foi significativamente mais 25 alta do que aquela emitida pelas células que expressam o aequorin tipo selvagem. De modo interessante, EGFP tipo selvagem procede diferentemente apresentando fluorescência na ausência de qualquer cofator, o EGFP-aequorin exigiu a

presença do cofator de aequorin, coelenterazina, antes que a fluorescência fosse observada.

#### *Desenvolvimento de Ensaios para Amostras Clínicas*

Existem muitas aplicações onde uma técnica rápida de identificação de patógeno seria extremamente valiosa. Por exemplo, um teste rápido asseguraria o tratamento oportuno, exato de pacientes nos estágios iniciais de infecção onde o tratamento imediato é importante, como no caso da inalação de antrax. Investigou-se conseqüentemente o uso de CANARY para detectar os patógenos em amostras clínicas relevantes. Pelo menos 50cfu de esporos *B. anthracis* adicionados aos chumaços nasais antes da preparação da amostra podem ser detectados. Neste protocolo os chumaços foram colocados em um cesto contendo um filtro de 5µm com 400µL de meio de ensaio. O eluído foi coletado em um tubo de microcentrífuga de 1.5mL em 2 minutos de centrifugação, uma etapa que igualmente serviria para concentrar os esporos no fundo do tubo. Após a centrifugação, o cesto e o chumaço são removidos e o ensaio é realizado no mesmo tubo. O tempo total do ensaio é menor do que 5 minutos, e assim, CANARY provê um primeiro resultado excelente para os povos que podem ter sido expostos a esporos de *B. anthracis* aerosolizado, permitindo desse modo, o tratamento imediato.

Um outro exemplo é a necessidade de testes com diagnóstico rápidos de pronto-atendimento que assegurem o tratamento e o controle das doenças, tais como aquelas que são sexualmente transmitidas, para que haja uma alta taxa de não submetida à medicação. *C. trachomatis* é uma doença transmitida sexualmente, que tem uma alta prevalência,

podendo causar problemas de doença pélvica inflamatória e problemas de fertilidade, e sendo pouco diagnosticada por causa do alto número de casos assintomáticos. Historicamente, a doença foi diagnosticada a partir das  
5 regiões cervical ou ureteral com testes que exigem o tempo e a perícia considerável. Embora os corpos elementares (EBs) do organismo possam ser encontrados na urina, uma amostra de coleta menos invasiva, esta é pouco encontrada atualmente, até recentemente, os únicos testes sensíveis o  
10 bastante para serem eficazes eram aqueles que amplificam ácidos nuclícos. Em um relatório recente, a concentração de *C. trachomatis* na urina dos pacientes contaminados determinou-se como variando de 30 a  $2 \times 10^5$  EBs/mL usando-se uma reação em cadeia quantitativa da ligase, um ensaio  
15 que tomava diversas horas para ser realizado (Abbott). Devido ao desempenho rápido de CANARY, foi-se capaz de demonstrar uma detecção de 500 *C. trachomatis* EBs na urina em menos de 5 minutos. Assim, CANARY é igualmente útil como um ensaio rápido, sensível para o diagnóstico de infecções  
20 de *C. trachomatis* em um teste não invasivo.

O sangue inteiro é uma matriz difícil de se analisar por causa de sua opacidade e da presença de ativadores e de inibidores de ensaio de CANARY. O método que foi desenvolvido conta com o uso dos tubos de separação de  
25 plasma (PST) e de centrifugação diferencial. Neste processo se usa um gel tixotrópico com uma densidade entre aquela do plasma e dos glóbulos celulares, que forma uma barreira entre o plasma e as células durante a centrifugação. Qualquer bactéria ou vírus presente no sangue permanece na

fase de plasma após a centrifugação, que pode então ser colhida e testada em CANARY. Usando um dispositivo montado com peças não muito disponíveis no comércio ("COTS"), demonstrou-se a separação de amostras de sangue inteiro em 5 três etapas rápidas, simples. Meio mililitro de sangue inteiro é coletado em um tubo heparinizado de separação de plasma (etapa 1) e centrifugado por 90 segundos (etapa 2). O plasma de contenção de patógeno separado, com o volume recuperado que varia de 50 a 250 $\mu$ L, é coletado em um tubo 10 de ensaio por inversão (etapa 3). 50 $\mu$ L de plasma é misturado com os 0.5 mL de meio de ensaio (um processo que reduz o efeito de um ativador de célula de CANARY que esteja presente no plasma, como explicado mais detalhadamente abaixo) e a mistura é centrifugada para 15 peletizar o patógeno. A amostra é testada então com células de CANARY patógeno-específicas. O tempo total exigido de coleta de sangue para detecção de patógeno é ~5 minutos. Usando o método de PST, o LOD é o -1000cfu de sangue inteiro vivo, avirulento de *Y. pestis*/mL. Usando 50 $\mu$ L de 20 200 $\mu$ L de plasma recuperado de 0.5 mL do sangue inteiro, detectou-se tão pouco quanto 125cfu (recuperação cheia presumida) por amostra de sangue inteiro. Estes resultados foram consistentes para cada doador testado até agora.

Como mencionado anteriormente, o plasma humano contém 25 um ativador de célula B que interfere com o ensaio de CANARY, tornando difícil obter um sinal claro a partir de concentrações baixas do agente que pode ser diferenciado a partir da experiência. O sinal é produzido por picos do ativador posterior a um sinal induzido por patógeno, e a

amplitude do sinal é dependente de doador, variando de fracamente perceptível para várias ordens de magnitude. Foram desenvolvidos três métodos de preparação de amostra que, efetivamente, removem o ativador. O método 1 tem a vantagem pelo fato de que o ativador é solúvel e pode, portanto, ser removido pela substituição do plasma com tampão de ensaio. Essa técnica é efetiva com bactérias e grandes quantidades de vírus que podem ser sedimentados com por centrifugação antes da substituição, mas para pequenos vírus ou proteínas solúveis. O método 2 envolve a diluição do efeito do ativador pela adição de um excesso de ensaio de CANARY para a amostra de plasma. Esse método é mais rápido e simples, mas necessita de testes adicionais para assegurar sua efetividade com uma variedade de amostras de sangue, particularmente aquelas que contém um ativador de nível elevado. O método 3 utiliza um pré-tratamento de amostra de plasma com células B que funcionam como adsorvente para o ativador.

Para detectar patógenos intracelulares em células brancas do sangue, um método foi desenvolvido no qual modificações foram incorporadas ao dispositivo de protótipo projetadas para detectar patógenos no plasma. Essas modificações são baseadas em um tubo vacutainer de sangue disponível comercialmente, Tubo de Preparação de Célula (CPT). Esse tubo foi projetado para coletar o sangue total e separar células brancas do sangue mononucleares pela combinação de um gel de poliéster e um meio de isolamento de célula por gradiente de densidade em um único tubo. A separação das células ocorre durante uma etapa de

centrifugação única. As desvantagens dos tubos comerciais são que eles requerem pelo menos 6 mL de sangue e um mínimo de 15 minutos de centrifugação. Pela incorporação do gel CTP e meio de gradiente de densidade no dispositivo de processamento feito de costume descrito acima, a quantidade de sangue é reduzida a 0,5 mL e o tempo de centrifugação é apenas 90 segundos.

Para que a separação adequada de células do sangue ocorra o sangue total deve ser diluído a pelo menos 6:1 com salina tamponada de fosfato (PBS); portanto, 100  $\mu$ L de PBS é colocado sob o gel. O dispositivo está, então, pronto para processar uma amostra de sangue. Todo o sangue heparinizado (600  $\mu$ L) é colocado em um tubo, o tubo é invertido para misturar o sangue com o PBS. Após 90 segundos de centrifugação, o sangue se separa em seus vários componentes. O plugue vermelho no topo do dispositivo é substituído com um tubo de ensaio e o plasma e as células brancas do sangue são coletadas no tubo de ensaio por inversão.

A distribuição de patógenos intracelulares é alcançada pela adição de reagente lisante de célula M-Per ao tubo de ensaio e incubação a temperatura ambiente por 5 minutos com circulação periódica. A amostra é centrifugada por 1 minuto para sedimentar o patógeno, o sobrenadante é substituído com 500  $\mu$ L de meio de ensaio, misturado em vórtice, e a centrifugação foi repetida. O tempo total a partir da coleta de sangue até a detecção do agente é ~ 12 minutos. A detecção de 1.000 cfu de *Y. pestis* vivas por mL do sangue total (600 cfu/ensaio) foi alcançado. Esse método pode

funcionar bem para detecção de patógenos intracelulares que podem ser concentrados por centrifugação a baixa velocidade (por exemplo, bactérias e vírus grandes).

#### Validação

5 A validação foi realizada de modo que a sensibilidade e a reatividade cruzada foram testadas usando a linhagem de célula *C. trachomatis*. A reatividade cruzada foi observada com apenas 2 de 22 tipos de bactérias testadas, e apenas em concentrações muito elevadas ( $10^7$ /mL). Embora a bactéria  
10 *Streptococcus pneumoniae* produza uma reação positiva, é apenas o polissacarídeo monomérico da bactéria que aparece na urina de um paciente com pneumonia, e antígenos monoméricos não estimulam as células B de CANARY. A outra bactéria que reagiu de forma cruzada, *Gemella morbillorum*,  
15 é um organismo intestinal normal que pode contaminar uma amostra de urina, mas é improvável em uma concentração elevada. A sensibilidade da linhagem de célula *C. trachomatis* variou de 10 a 150 EBs (10, 50, e 150 para tipos sorológicos D, H, e K, respectivamente), dependendo  
20 do tipo sorológico de *C. trachomatis* testado. Entretanto, uma vez que diferentes lotes geram resultados levemente diferentes, a faixa de sensibilidade pode ter sido devido à exatidão da quantificação e não da resposta diferencial da linhagem de célula. Em qualquer caso, o LOD determinado  
25 pela validação foi na faixa de 10 a 100.

#### Conclusão

O biosensor a base de célula B de CANARY utiliza um sistema altamente desenvolvido para identificação de patógeno que provê várias vantagens sobre outras

tecnologias de identificação. Com CANARY é possível prover identificação em menos de 5 minutos, e com aqueles patógenos grandes o suficiente para serem concentrados em uma microfuge, demonstrou-se um nível de sensibilidade que se aproxima do PCR. Em comparação, imunoenaios do estado da técnica requerem pelo menos 14 minutos e tem um maior limite de detecção ( $6 \times 10^4$  cfu ou  $6 \times 10^6$  pfu). Embora o PCR seja extremamente sensível (1 a 5 cfu), altamente específico e se aproveite de avanços tecnológicos que reduziram o tempo para amplificação e detecção de sinal, o ensaio leva pelo menos 7 min. (mais tipicamente 20 - 30 min.), não incluindo o tempo requerido para extrair e purificar o DNA. Aplicações que se beneficiariam de tal tecnologia incluem diagnóstico laboratoriais rápidos (point-of-care) para doenças onde a taxa de retorno para tratamento é baixa, mas o impacto social é elevado, tais como, doenças transmitidas sexualmente. Além disso, CANARY seria valioso para detecção de patógenos agrícolas em portas de entrada, detecção pré-sintomática a partir de swabs nasais como consequência de um ataque de guerra biológica, ou seleção de suprimentos de alimentos perecíveis. De fato, CANARY é um método sensível rápido, que pode possibilitar a detecção e identificação de patógenos altamente infecciosos em qualquer ajuste crítico de tempo.

*Dieletroforese para Concentração de Partículas Pequenas*

Introdução: O ensaio de CANARY pode usar centrifugação como uma etapa chave na co-localização de partículas

contendo antígeno antes de introduzi-las as células B para reconhecimento e geração de sinal. Essa aproximação tem sido altamente bem sucedida na detecção rápida de alvos de bactérias e vírus que possuem tamanhos de partícula maiores que 500 nm; entretanto, alguns alvos virais, sendo muito pequenos, são mais difíceis de concentrar dessa maneira e podem requerer centrifugação mais extensa em velocidades muito altas, e/ou a adição de etapas tais como, ligação intermediária das partículas alvo às microesferas, para melhorar a sedimentação das partículas compostas. Para determinar as velocidades de centrifugação requeridas para sedimentar partículas de um dado tamanho, pode-se usar a Lei de Stokes de sedimentação (Equação 1) para calcular a velocidade da partícula em um fluido como função da viscosidade do fluido e parâmetros rotacionais.

$$v_p = \frac{2}{9} r_p^2 \left( \frac{\rho_p - \rho_m}{\mu} \right) D \left( \frac{2\pi N}{60} \right)^2$$

**$v_p$  = velocidade da partícula**  
 **$r_p$  = raio da partícula**  
 **$\rho$  = densidade**  
 **$\mu$  = viscosidade do fluido**  
**D = raio centrífugo**  
**N = velocidade rotacional**

20

Como um exemplo, usando-se a atual centrífuga CANARY de bancada tendo uma velocidade máxima de 18.800 rpm, concentração de partículas virais VEE (diâmetro 70 nm) através de um volume de amostra típico de 50  $\mu$ L em um tubo de microcentrífuga levaria aproximadamente 15 minutos. Usando uma ultracentrífuga com velocidades de giro de até 100.000 rpm seria possível reduzir esse tempo de

25

sedimentação para menos de 1 minuto, mas com a complexidade associada ao equipamento requerido.

Foram desenvolvidos métodos a base de não centrifugação para concentração de partículas pequenas, um sendo eletrocinético ou métodos a base de campo elétrico. A mais bem conhecida dessas técnicas é a eletroforese, que tem sido usada com muito êxito por muitos anos para manipular e separar partículas carregadas e moléculas grandes, inclusive DNA e proteínas, em meio com base de gel e líquidos. Isso se baseia na aplicação de um campo elétrico através do meio em que as partículas residem; sob a influência desse campo (constante), partículas carregadas migrarão para um dos eletrodos. A direção e a taxa de migração das partículas depende de suas carga e tamanho. Bem como das propriedades do meio, incluindo o pH e força iônica. Eletroforese é uma técnica altamente útil para a manipulação de partículas carregadas de uma maneira relativamente imprecisa. Entretanto, concentrar partículas para locais particulares e, adicionalmente, se essas partículas não são necessariamente carregadas, mas são polarizadas, então a técnica chamada dieletroforese é usada.

#### *Dieletroforese - O Básico*

O termo dieletroforese (DEP) foi usado primeiramente por Pohl, que foi capaz de induzir movimento e separação de múltiplos tipos de células pelo uso de um campo elétrico monouniforme para gerar uma separação de carga (polarização, criando um dipolo) nas partículas descarregadas. Existem dois modos de DEP, o positivo e o

negativo, conforme ilustrado na FIG. 181; o modo é determinado pela polarizabilidade relativa das partículas com relação ao meio adjacente. Em ambos os casos, a partícula e o meio experimentam uma separação de carga sob um campo elétrico monouniforme aplicado. Se a partícula é mais polarizável que o meio, o dipolo da rede resulta na atração de partícula em direção a região de campo elétrico mais elevado; Isso é atribuído à DEP positiva. Se a partícula é menos polarizável que o meio, então o meio fluido migra em direção a região de campo elevado, que empurra a partícula em direção ao mínimo campo elétrico. Essa é a DEP negativa.

Observe que se a polaridade do campo elétrico é mudada, as cargas induzidas e dipolos também mudam as polaridades, de modo que as partículas ainda se movem na mesma direção; isso possibilita o uso de campos de corrente alternada (AC) para manipular a partícula. Campos de AC permitem o aproveitamento da polarizabilidade da partícula que é dependente da frequência; isso significa que a mesma partícula pode experimentar DEP positiva ou negativa, dependendo da frequência do campo aplicado. Campos de AC são também mais desejáveis que os DC porque eles não resultam em geração de rede de gás significativa nos eletrodos devido a eletrólise. Geralmente, em frequências baixas uma partícula experimentará dieletroforese positiva, uma vez que existe tempo suficiente em cada ciclo para que as cargas das partículas se separem com relação as cargas do meio. Em frequências altas, a distribuição de cargas dentro das partículas não pode se "manter", e a partícula

torna-se menos polarizável com relação ao meio, colocando-o em regime de dieletroforese negativa. A DEP positiva pode ser usada para concentrar partículas nos eletrodos, e a DEP negativa, para aprisioná-las nos "poços" de campo elétrico distante dos eletrodos. A frequência na qual a partícula muda da DEP positiva para a negativa é chamada de frequência de corte.

A equação 2 mostra os fatores que influenciam a força dieletroforética ( $F_{DEP}$ ); a força é proporcional ao quadrado da voltagem aplicada ( $V$ ) e ao cubo do raio da partícula ( $r$ ), e inversamente proporcional a distância ( $d$ ) do eletrodo. Esta também é uma função da permissividade relativa da partícula ( $\epsilon_p^*$ ) e do meio ( $\epsilon_m^*$ ), ambos os quais são dependentes da frequência ( $\omega$ ), como indicado pelo seu efeito no fator de Clausius-Mossotti  $K(\omega)$ .

$$F_{DEP} = 2\pi r^3 \epsilon_m \operatorname{Re}[K(\omega)] \nabla E^2 \quad \nabla E^2 \propto \frac{V^2}{d^3} \quad K(\omega) = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \quad (2)$$

Existem muitas demonstrações de uso da DEO positiva e negativa para manipular e aprisionar células e partículas grandes ( $> 1 \mu\text{m}$ ). Mais recentemente, com os avanços nos métodos de fabricação que possibilitam a formação de eletrodos de geometria menor, a DEP também tem sido usada para aprisionar vírus grandes e mesmo macromoléculas como proteínas e DNA. Usamos a DEP para concentrar partículas com menos que 100 nm em diâmetro, um problema desafiador na medida em que a Equação 2 indica claramente que na medida em que o tamanho da partícula diminui, existe uma

necessidade de aumentar substancialmente o campo elétrico aplicado (possivelmente gerando eletrólise) e/ou diminuir a geometria e distância do eletrodo (que complica o processo e fabricação).

## 5 *Materiais e Métodos*

### Projeto do Chip de DEP

Um conjunto de dispositivos com várias geometrias de eletrodos interdigitados foram fabricados. Cada dispositivo consistiu de um conjunto de linhas de platina depositadas em um chip de quartzo quadrado com dimensões de 25 mm X 25 mm X 0,5 mm, com o eletrodo-padrão definido usando-se um processo liftoff convencional no qual a imagem negativa do metal padrão é formada fotolitograficamente usando um polímero fotosensitivo, após do que a platina é depositada usando evaporação por feixes de elétrons e o excesso de platina é removido mediante a dissolução do fotopolímero subjacente (FIG. 182). A FIG.183 o eletrodo-padrão básico e um chip de dispositivo completo. Além dos dois eletrodos-padrão lineares, um pequeno número de estruturas de quatro eletrodos também foram fabricadas; estas podem ser usadas para alcançar a dielectroforese com ondas progressivas, na qual quatro sinais AC, separados igualmente em fase, são aplicados aos eletrodos para deslocar as partículas ao longo da estrutura para o centro da espiral.

## 25 *Arranjo de Teste*

Dois arranjos foram usados para exercitar os chips de DEP, um no qual os chips foram mantidos de forma horizontal e o outro no qual eles foram mantidos na forma vertical. Observe que apesar das simulações terem usado uma estrutura

de chip duplo, os experimentos iniciais apenas usaram um conjunto único de eletrodos, para demonstrar a atração e repulsão das partículas de teste por meio de DEP positiva e negativa, respectivamente. Tanto na configuração horizontal quanto na vertical, o canal de fluido foi formado mediante o imprensamento de uma junta de silicone de 125  $\mu\text{m}$  de espessura entre o chip contendo o eletrodo e um chip de quartzo plano. O dispositivo foi mantido em um dos dois tipos de arrumação, o acesso elétrico foi obtido por meio de cliques de alavanca de cobre que contatavam blocos de metal conectados aos eletrodos interdigitados no chip contendo o eletrodo.

O movimento de microesfera foi gerado mediante aplicação de uma onda quadrada através dos dois eletrodos, de amplitude 1-10 V (pico a pico) a uma frequência de 1 Hz a 10 MHz, usando um gerador de função Hewlett Packard HP237. As partículas de teste consistiam de microesferas de poliestireno identificadas de forma fluorescente (Bangs Laboratories, emissão a 655 nm) de vários diâmetros, suspensas em água destilada. Na configuração horizontal, a movimentação da microesfera foi observada de um modo estático mediante o enchimento do canal com microesferas suspensas no fluido, aplicação de campo, e formação de imagem do movimento da microesfera. Na configuração vertical, o fluxo de fluido foi gerado mediante a aplicação de uma quantidade pequena de material absorvente em uma extremidade do canal para atuar como uma mecha de material absorvente ("wick"). As imagens das partículas foram capturadas usando uma câmara CCD conectada a um microscópio

de fluorescência Olympus BX60 equipado com uma variedade de conjuntos de filtro de fluorescência, e registrados em um gravador de DVD.

#### *Resultados*

5 O objetivo dessa realização era mostrar a habilidade para localizar pequenas partículas usando DEP. Portanto, os dispositivos foram avaliados para mostrar essa habilidade tanto no modo DEP positivo quanto no modo DEP negativo. Em baixas frequências as microesferas exibiram  
10 DEP positiva, na qual as microesferas se localizaram nos eletrodos; na medida em que a frequência de excitação foi aumentada, em algum ponto as microesferas foram liberadas da superfície do eletrodo e começaram a se mover para longe dos eletrodos.

15 Usando a configuração horizontal foi possível mostrar a atração e repulsão de microesferas com diâmetro de 2,7- $\mu\text{m}$  e 0,3- $\mu\text{m}$  usando eletrodos com largura de linha de 5- $\mu\text{m}$ , mas não foi possível determinar a distância de repulsão devido a configuração do arranjo de teste, na qual os chips  
20 foram mantidos na forma horizontal e observados conforme exposto acima. Subseqüentemente, dispositivos fabricados contendo eletrodos com largura de linha de 2- $\mu\text{m}$  foram feitos e testados na configuração vertical.

#### *Conclusões*

25 Foi possível demonstrar o movimento dieletoforético positivo e o negativo de 300-nm e partículas grandes usando eletrodos de metal interdigitados com largura de onda de 2  $\mu\text{m}$ . No regime DEP negativo, partículas foram repelidas a partir da superfície do eletrodo a uma distância de até 20

µm. A DEP negativa também foi demonstrada usando-se partículas de 50 nm. Mas com uma distância de repulsão de apenas 5 µm. O objetivo eventual dessa realização era concentrar partículas menores que 100 nm de diâmetro, e adicionalmente, ser capaz de repeli-las a uma distância adequada longe dos eletrodos acionadores para ser capaz de separar a superfície concentrada de partículas do restante do fluido de amostra. Uma distância de repulsão de pelo menos 100 µm facilitaria essa separação em um canal microfluídico, mas com os presentes dispositivos foi possível alcançar uma distância de repulsão de menos que 20 µm. Ao se considerar os parâmetros que controlam a força de DEP efetiva, constata-se sua escala como sendo o cubo inverso da largura de linha do eletrodo. Isso indica que uma redução de 10 X na largura de linha geraria um aumento de 1000 X na força de DEP, e um aumento correspondente na distância de repulsão para uma dada voltagem de acionamento e um dado diâmetro de partícula. Eletrodos com largura de linha de 2 µm podem ser fabricados usando os avançados sistemas de fotolitografia, e estes dispositivos possibilitarão concentração de partículas de 50 nm.

#### *Detecção de Toxina com CANARY*

##### *Materiais e Métodos*

*GST-BoNT/A e Expressão Recombinante de E Hc e Purificação*  
25 cDNAs codificando BoNT/A Hc e BoNT/E Hc em plasmídio pGEX-4T3.

Plasmídios foram transfectados em BL21 (DE3) pLys (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Bactérias abrigando plasmídios foram diluídas a partir de

culturas cultivadas durante a noite e crescidas em OD600 de ~ 0,5, IPTG foi adicionado até uma concentração final de 400  $\mu$ M, e a incubação foi continuada a 30 °C por 4 horas. As bactérias foram coletadas e cada litro foi ressuspensão em 30 mL de BugBuster com 30  $\mu$ L de benzonase nucleasa (Novagen), e o tubo foi rotacionado a temperatura ambiente por 20 minutos. O lisado foi centrifugado a 21.000 RCF por 30 minutos a 4°C, a proteína solúvel foi decantada em 3 mL de glutathiona sefarose (Amersham Biosciences), balanceada com PSB, EDTA 1 mM. A pasta foi agitada com giros a 4°C por 2 horas e vertida em 20 mL de coluna disponível (BioRad). A coluna foi lavada com PBS/EDTA, e proteína recombinante foi eluída em glutathiona 10 mM e Tris 100 mM, pH 8,0.

#### Matrizes não-Médicas

Um sétimo (1/7) de volume de HNa 7X (NaCl 560 mM, Hepes 1,4 M pH 7,9, e microesferas revestidas com anticorpos) foi adicionado a solução dopada de antígeno. No final de uma etapa de ligação de 12 minutos, 190  $\mu$ L de meio de ensaio foi adicionado, o tubo foi colocado no ímã por 30 segundos, e o sobrenadante, descartado. As microesferas foram ressuspensas em 50  $\mu$ L de meio de ensaio, 20  $\mu$ L de células foram adicionadas, o tubo foi posta para girar por 5 segundos para sedimentar as microesferas e as células CANARY, produção de luz monitorada em um luminômetro.

#### *Produção de Anticorpo*

Hibridomas foram aclimatizados em meio de hibridoma SFM (Gibco) + 1X aminoácidos não essenciais (Gibco, piruvato de sódio 100  $\mu$ M, L-glutamina 200  $\mu$ M). Alguns

hibridomas requereram inicialmente 10 % de soro, mas todos os anticorpos foram, finalmente, produzidos em meio contendo 10 % de soro.

#### *Purificação de Anticorpo*

5 Sobrenadantes de hibridomas produzidos em meio livre de soro foram centrifugados a 3.700 RPM em centrífuga clínica, e o sobrenadante foi filtrado em 0,2 micron. Então, 1 mL de Proteína G Sefarose 4 de fluxo rápido balanceada em PBS (GE Healthcare) foi adicionada ao  
10 sobrenadante e agitadas com giros lentamente ou de 3 a 4 horas a temperatura ambiente ou durante a noite a 4 °C. Resina foi vertida em uma coluna disponível, lavada com PBS, e frações de 1 mL foram eluídas com KPO<sub>4</sub> pH 2,7 diretamente em 100 µL de HEPES 1 M, tampão de pH 8,5 foi  
15 trocado por PBS usando colunas NAP-5.

#### *Reticulação para Gerar Resina de Proteína G*

Microesferas (DynaL Dynabeads Protein G) foram lavadas em NaOAc 50 mM, pH 5,0. O pH do sobrenadante de hibridoma foi ajustado para aproximadamente 5,0, BSA a 0,1  
20 % foi adicionado, e a solução foi filtrada em filtros de 2,5 microns. Então, 100 µL de microesferas foram adicionados a 10 mL de sobrenadante de hibridoma, e o tubo foi rotacionado a temperatura ambiente. As microesferas foram lavadas em borato de sódio 0,2 M, pH 8,0, e  
25 ressuspensas em 1 mL de borato contendo DMP 20 mM. O tubo foi rotacionado a temperatura ambiente por 30 minutos, 250 µL de Tris 1 M, pH 8,0, foi adicionado, e o tubo foi incubado por 15 minutos. As microesferas foram lavadas em PBS + Triton X-100 a 0,05 %, e ressuspensas em 1 mL.

Aproximadamente 0,4  $\mu$ L de microesferas foram usadas em ensaio de CANARY para a maioria dos experimentos.

#### *Reticulação de Biotina*

Anticorpo foi concentrado até aproximadamente 1 mg/mL antes da conjugação usando concentradores centrífugos Omega 30K Nanosep. Biotina (Sulfo-NHS-LC-LC-Biotina, Pierce) foi ressuspensa em PBS a 10 mM. Biotina foi adicionada com excesso molar de 20 vezes sob o anticorpo, o qual foi incubado a temperatura ambiente por 30 minutos. Tris, pH 7,5, foi adicionado a 100 mM, e o tampão, trocado em PBS. Anticorpos biotinilados foram adicionados a microesferas do tipo Dynabeads M-280 (Dynal) em concentração suficiente para saturar locais de ligações (20  $\mu$ g de anticorpo por mg de microesferas) e incubados a temperatura ambiente por 30 minutos. As microesferas foram coletadas, lavadas e armazenadas em PBS + Triton X-100 a 0,05%. Tipicamente, as microesferas foram diluídas até um décimo de sua concentração de estoque original, e foi usado 0,4  $\mu$ L de microesferas por ensaio de CANARY.

#### *Introdução*

CANARY demonstrou desempenho excepcional na detecção de vírus e bactérias. A detecção de toxinas apresenta um problema diferente. A dificuldade para detecção de toxinas é que enquanto um anticorpo expresso na superfície de células B pode se ligar a duas moléculas de toxina, cada molécula de toxina pode se ligar a apenas um anticorpo. Isso significa que os anticorpos não serão reticulados toxinas monoméricas, solúveis e que, conseqüentemente, a

cascata intracelular que leva a emissão de luz a partir de célula CANARY não será iniciada.

Um método eficaz para superar este problema é capturar toxinas em microesferas. Essas microesferas revestidas com toxinas podem, então, reticular múltiplos anticorpos na superfície de células CANARY e estimular a emissão de luz. O uso de microesferas de captura também facilita a transferência de toxina de proteína solúvel a partir de soluções incompatíveis de células (contendo estimuladores não específicos ou inibidores de células CANARY) em soluções compatíveis de célula CANARY. Essa importante capacidade expande muito os tipos de matrizes nas quais o CANARY pode ser potencialmente usado para detectar toxinas.

#### *Deteccção de Toxina Botulínica*

Formas de toxina: Vários tipos de antígeno de neurotoxina botulínica A (BoNT/A) foram usados, dependendo do propósito do experimento e da maturação do ensaio de toxina.

Fusão GST de BoNT/A de cadeia pesada (BoNT/Hc) produzida em *E. coli*. Essa proteína recombinante foi usada para selecionar "pools" de células CANARY para aqueles que expressam anticorpos BoNT/A. A fusão GST permitiu fácil fixação do antígeno às microesferas e seleção de células CANARY. BoNT/E Hc recombinante foi usado como controle para demonstrar que a resposta de células CANARY foram específicas para BoNT/A (os anticorpos não se ligam a BoNT/E). Entretanto, proteínas GSTs têm uma propensão a se dimerizarem em solução e, portanto, não são um alvo

adequado para demonstrar a habilidade de CANARY para detectar proteínas monoméricas.

BoNT/Hc Comercial. Essa porção não tóxica da BoNT/A é isolada a partir de toxina nativa e precisa ser capturado da solução usando um anticorpo contra BoNT/A. Esse é um bom modelo para detecção de proteína solúvel, mas a porção de cadeia pesada do BoNT não é tão estável quanto a da holotoxina, e essa instabilidade causou medições de sensibilidade usando esse difícil antígeno. Consideravelmente, isso também não demonstra, realmente, a habilidade de detectar BoNT/A ativa.

BoNT/A. A maioria dos experimentos foram realizados usando BoNT/A ativa adquirida de uma fonte comercial (Metabiologics).

Complexo de BoNT/A. BoNT/A na medida que é produzida pelo *Clostridium botulinum* é complexada com uma variedade de outras proteínas. Essas proteínas associadas bloqueiam a ligação de alguns anticorpos, então é necessário demonstrar que o ensaio de CANARY desenvolvido usando esses anticorpos pode detectar não apenas BoNT/A, mas também complexo de BoNT/A.

#### *Anticorpos*

A maioria dos experimentos usou anticorpos derivados de hibridomas 6E10-10, 6C2-4 e 6B2-2. Esses anticorpos ligam-se a epítomos independentes no BoNT/A. A maioria dos experimentos descritos abaixo usou células CANARY que expressam anticorpo 6B2-2 para detectar antígeno de BoNT/A capturado em anticorpo 6E10-10 ligado a microesferas.

Experimentos adicionais também usaram anticorpos CR1, Raz e S25, cada um dos quais liga-se a 3 epítomos separadas na proteína BoNT/A. Esses anticorpos foram usados para determinar o efeito da afinidade do anticorpo na sensibilidade do ensaio de CANARY.

*Microesferas:* Glutathiona sefarose foi usada para capturar BoNT/A Hc recombinante para apresentação às células CANARY para seleção e teste inicial. Microesferas revestidas com proteína G (sefarose ou paramagnético) foram reticuladas para capturar anticorpos e usadas para capturar produtos de BoNT/A solúveis em solução para apresentação às células CANARY. Microesferas paramagnéticas revestidas com estreptavidina foram revestidas com anticorpos marcados com biotina. Essas microesferas foram mais reproduzíveis, e porque elas são paramagnéticas, também permitem preparação da amostra (captura de toxina e lavagem das microesferas) sem requerer centrifugação.

*Resultados: Experimentos Usando Simuladores para Toxina BoNT/A*

Os genes que codificam anticorpos para diferentes epítomos na BoNT/A Hc (6B2-2 e 6E10-10) foram clonados e expressos em linhagens de célula B separada para estimar sua função. Ambos os resultados de linhagem de célula responderam a proteína de fusão GST-BoNT/A Hc ligada a microesferas de glutathiona-sefarose. Para testar função de células CANARY, o antígeno recombinante foi capturado em microesferas de glutathiona, as microesferas foram lavadas em meio de ensaio, e o antígeno de captura foi apresentado às células CANARY que expressam anticorpo 6E10-10. A

resposta da célula CANARY 6B2-2 pôde ser parcialmente anulada mediante a incubação da BoNT/A Hc-GST ligada a microesferas com anticorpo 6B2-2 por 2,5 horas ou durante a noite. A BoNT/E Hc-GST capturada em microesferas de glutathiona não estimulou as células, demonstrando que a resposta CANARY é estimulada pela interação com o antígeno, e não de forma não específica pelas microesferas ou pela toxina.

As proteínas GST dimerizam em solução e, portanto, não podem ser usadas para demonstrar a habilidade do CANARY para detectar proteína monomérica, solúvel. Para mostrar a captura de antígeno monomérico, solúvel a partir da solução, foi usada a BoNT/A Hc purificada a partir de BoNT/A nativa (Metabiologics). O anticorpo 6E10-10 foi conjugado em microesferas marcadas de proteína G, e essas microesferas foram incubadas com concentrações diferentes de BoNT/A Hc. Células CANARY foram adicionadas às microesferas revestidas com BoNT/A Hc, e a mistura foi centrifugada por 5 segundos par co-sedimentar as microesferas e as células. O antígeno capturado estimulou efetivamente as células CANARY em um modo de dose-específica, com uma sensibilidade aparente de 800 pg (80 ng/mL). O tempo total de ensaio para esse experimento foi < 5 minutos, incluindo ligação de microesfera, adição de célula e medição de produção de luz.

Entretanto, BoNT/A Hc se agregou durante o armazenamento, tornando difíceis as medições de exatidão de sensibilidade de ensaio. BoNT/A Hc não congelado produziu uma maior resposta que a BoNT/A Hc que foi congelada. O

sobrenadante do centrifugado, BoNT/A Hc congelado-descongelado, exibiu menos atividade ainda, indicando que agregados foram formados durante o processo de congelamento-descongelamento. Além disso, as características de armazenamento, com variabilidade lote-a-lote também afetaram a habilidade para determinar a sensibilidade de forma exata. Uma vez que é importante demonstrar que CANARY é capaz de detectar proteína solúvel, tipicamente a BoNT/A Hc foi ensaiada a qual foi armazenada congelada e centrifugada ao descongelar para remover os agregados.

Algumas soluções, tais como, suco de laranja ou água, são incompatíveis com ensaio de CANARY, então foi necessário trocar a solução original contendo o simulador de toxina com o meio de ensaio. Além disso, foi verificado que algumas matrizes afetaram não apenas as células, mas também a captura de toxina pelas microesferas revestidas com anticorpos. Por exemplo, o suco de laranja foi problemático por causa de seu baixo pH (pH = 3,5). A solução foi projetar um agente de tamponamento único que, quando adicionado a uma ampla variedade de soluções, normalizou o pH e criou uma concentração mínima de sal para permitir a captura específica do antígeno. Para esses experimentos, foi criado um tampão concentrado (7xHNa) para adicionar a todos os líquidos para elevar a concentração final de sal a pelo menos 80 mM, e tamponar o pH das soluções ácidas, tais como o suco de laranja, para aproximadamente 6,5. As microesferas podiam ser armazenadas nesse tampão, desse modo, o ensaio de toxina ainda requereu

a adição de apenas uma única solução (7xHNa + microesferas capturadas) para a amostra. As microesferas revestidas com anticorpos foram incubadas em solução por 12 minutos, lavadas com meio de amostra e usadas no ensaio de CANARY. O LOD para BoNT/A Hc, definido como 3 vezes superior ao experimento de base, foi 80 ng/mL. Embora a sensibilidade do CANARY para BoNT/A Hc em suco de laranja e PBS/Tx-100 fosse comparável com a do controle, o leite provou ser inibitório (aproximadamente 20% do controle), indicando que a preparação da amostra teria que ser alterada para alcançar sensibilidade ideal nessa matriz. Os resultados iniciais indicaram que o aumento a concentração do sal no leite pode melhorar a sensibilidade.

Várias matrizes medicinalmente relevantes também foram testadas e cada uma requereu um método específico para preparação de amostra. O procedimento desenvolvido para ensaiar amostras nasais envolveu a coleta de amostras em swabs, a haste do swab foi aparada, e a extremidade do swab foi colocada em um cesto com filtro de 5 microns ajustado em um tubo eppendorf. O meio de ensaio contendo BoNT/A Hc foi adicionado, e o conjunto foi tampado e centrifugado. O eluato do filtrado foi coletado em tubo eppendorf e ensaiado usando o procedimento de captura por microesfera descrito acima. Os sinais a partir de swabs de controle e real com BoNT/Hc são muito similares, indicando que nenhum dos inibidores estão presentes nas amostras nasais. A falta de uma resposta CANARY para swabs nasal na ausência do antígeno (swab nasal) mostra que não existem quaisquer

estimuladores não específicos presentes na amostra de swab nasal.

*Toxina BoNT/A e Sensibilidade de Ensaio de CANARY*

Para demonstrar que CANARY detecta não apenas com  
5 toxina BoNT/Hc simuladora, mas também com a toxina BoNT/A  
ativa, BoNT/A comercial foi adquirida e ensaiada usando  
toxina capturada com microesferas de 6E10-10 e detectadas  
usando células CANARY 6B2-2. O limite de detecção nesse  
ensaio foi de aproximadamente 8 ng/mL ou 80 pg de toxina,  
10 que é um melhoramento de aproximadamente 10 vezes mais que  
o LOD para toxina BoNT/A Hc simuladora. Amostras contendo  
16 pg de toxina (1,6 ng/mL) estimulam células a  
aproximadamente 3 vezes superior ao experimento de base,  
porém com um perfil cinético que não se ajusta ao algoritmo  
15 de detecção atual. Esse melhoramento na sensibilidade do  
ensaio também indica que toxina BoNT/A ativa permanece  
solúvel durante o armazenamento, ou que os anticorpos se  
ligaram melhor à toxina inteira que à cadeia pesada.

A detecção de toxina BoNT/A nas amostras reais também  
20 foram demonstradas. A detecção de toxina BoNT/A na urina  
foi realizada onde o limite de detecção era de 16 ng/mL e  
também foi efetiva para a detecção de toxina BoNT/A no  
sangue total. BoNT/A foi adicionada ao sangue total e o  
sangue foi brevemente centrifugado em meio a um polímero  
25 para facilitar a separação das células do material do  
material solúvel. Microesferas de 6E10-10 foram adicionadas  
ao sobrenadante resultante, incubadas por 2 minutos, e  
ensaiadas usando células CANARY 6B2-2. Como observado  
quando da detecção das toxinas simuladoras em leite, o

limite de detecção para esse ensaio, 16 ng/mL, é aproximadamente 5 vezes mais baixo que a sensibilidade vista usando meio de controle.

É possível que a elevada concentração de proteína em ambas as matrizes tenham inibido interações específicas entre anticorpos ligados as microesferas e a BoNT/A em solução. Em uma tentativa de aumentar a sensibilidade em soluções com elevadas concentrações de proteína, a adição de sal e detergentes não iônicos foi testada. O sal (NaCl), detergente não iônico (Tween-20 ou Triton X-100) ou combinações dos dois foram adicionados a 48 ng/mL de BoNT/A em plasma, e os resultados foram comparados com a adição de água. A adição de Triton X-100 melhorou o sinal, enquanto que a adição de Tween 20 não melhorou. A adição de sal individualmente teve um efeito mais dramático, aumentando a amplitude do sinal de 1700 RLU para aproximadamente 4800 RLU. A adição de detergente às amostras contendo sal não produziu um efeito aditivo. Isso indica que a adição de sal pode ter diminuído interações proteína-proteína não específica e aumentado a taxa de BoNT/A que se liga as microesferas revestidas com anticorpos.

#### *Otimização de Ensaio*

Seria esperado que a sensibilidade do ensaio de BoNT/A fosse dependente da densidade do antígeno em cada esfera que, por sua vez, é dependente do número de microesferas usadas para capturar a toxina em solução. O uso de um grande número de microesferas assegura a máxima eficiência de captura, mas se a concentração de toxina é baixa, o antígeno presente em cada microesfera pode estar muito

disperso para eliciar uma resposta celular efetiva. Portanto, um equilíbrio entre o número de microesferas e densidade de antígeno em cada microesfera precisa ser determinado. Para otimizar esses parâmetros, um conjunto de 5 experimentos foi realizado testando uma variedade de concentrações de microesferas com diferentes volumes de BoNT/A em 1,6 ng/mL. Em um de tais experimentos, números diferentes de microesferas foram adicionados a cada amostra e as amostras foram incubadas por 2 minutos. Quando 10 incubadas em volumes pequenos, grandes números de microesferas estimularam bem menos que pequenos números de microesferas. Isso indicaria que em amostras contendo quantidades baixas de toxina, a captura com grandes números de microesferas resulta em uma distribuição muito dispersa 15 do antígeno para estimular, de forma efetiva, as células CANARY.

Embora a extensão do tempo de captura melhore significativamente o LOD para 0,32 ng/mL de BoNT/A, também foi observado que o efeito do número de microesfera tornou-se 20 se mais pronunciado. Por exemplo, com microesferas incubadas durante a noite com 100 µL de BoNT/A em 0,32 ng/mL, diminuindo o número de microesfera de 300.000 para 3.000 melhorou o sinal. Poucas microesferas significa que cada microesfera terá mais toxina, melhorando o sinal na 25 medida em que o número de microesferas diminui.

A combinação de biotinar o anticorpo, melhorar a ligação e condições de lavagem e otimizar o número de microesfera levou a uma sensibilidade melhorada de 16 pg (1,6 ng/mL) em um ensaio de 6 minutos. Dezesseis picogramas

de toxina representam aproximadamente 0,000029 (1/34,370) de LD50 por inalação para uma pessoa de 55 Kg (120 lb). Isso é aproximadamente 0,00023 x LD50 por injeção, e 0,00000029 x LD50 por ingestão. Nesse nível de 5 sensibilidade o ensaio pode detectar aproximadamente 1 LD50 presente em 34 litros de fluido.

*Resultados para a Toxina Real: BoNT/A*

BoNT/A dopada em urina pôde ser detectada, entretanto, a amplitude de sinal foi um pouco reduzida quando comparada 10 com o controle (FIG. 158). Nesse experimento nenhum pré-tratamento foi usado, e microesferas revestida co 6E10-10 foram adicionadas diretamente à urina dopada com BoNT/A. O limite de detecção para BoNT/A na urina foi 16 ng/mL, comparado a 3,2 ng/mL para a toxina diluída diretamente no 15 meio de ensaio em experimentos paralelos.

CANARY também foi efetivo para seleção de BoNT/A no sangue total usando o procedimento de preparação de amostra descrito em outra parte (FIG. 159). O sangue total foi dopado com BoNT/A, e o sangue foi centrifugado rapidamente 20 em meio a um polímero para facilitar a separação de células do material solúvel. Microesferas revestidas com anticorpos 6E10-10 foram adicionadas ao sobrenadante, incubadas por 2 minutos e ensaiadas usando células CANARY 6B2-2. O limite de detecção para este ensaio é 16 ng/mL, aproximadamente 5 25 vezes mais baixa que a sensibilidade observada usando meio de controle. Esse método de preparação de amostra resultou em um melhoramento significativo diante de ensaios anteriores em plasma preparado por centrifugação na ausência de polímero.

No leite e no soro, o limite de detecção para toxina por ensaio de CANARY foi aproximadamente 5 vezes mais alto que os dos controles. É possível que isso tenha ocorrido devido a concentração elevada de proteína em ambas as matrizes que inibiu interações específicas entre anticorpos ligados a microesferas e o BoNT/A na solução. Em uma tentativa de melhorar a sensibilidade de soluções de elevada concentração de proteína, a adição de sal e detergentes não iônicos foi testada (FIG. 160). O sal (NaCl), o detergente não iônico (Tween-20 ou Triton X-100) ou combinações dos dois foram adicionados a 48 ng/mL BoNT/A em plasma, e os resultados foram comparados com os de adição de água. A adição de Triton X-100 melhorou o sinal, enquanto que a adição de Tween não melhorou. A adição de sal individualmente teve um efeito mais dramático, aumentando a amplitude do sinal de 1700 RLU para aproximadamente 4800 RLU. A adição de detergente às amostras contendo sal não produziu um efeito aditivo. Isso indica que a adição de sal pode ter diminuído interações proteína-proteína não específica, e aumentado a taxa de BoNT/A que se liga as microesferas revestidas com anticorpos.

Foi mostrado que CANARY pode detectar, de forma efetiva BoNT/A ativa, mas se a toxina é isolada a partir de certas cepas de *Clostridium botulinum*, a toxina será complexa com proteínas adicionais, criando um alvo antigenicamente diferente, complexo de BoNT/A. Consideravelmente, CANARY detectou complexo de BoNT/A com os mesmos níveis de resposta da BoNT/A (FIG. 161).

Quantidades equimoleculares de BoNT/A e complexos de BoNT/A (5 fmoles de cada) foram adicionadas a microesferas revestidas com 6E10-10, e a toxina capturada foi detectada usando células 6B2-2. A resposta de CANARY foi idêntica para ambas as preparações, indicando que os epítomos no BoNT/A ligados por esses anticorpos não foram bloqueados por proteínas de complexo de BoNT/A.

Foram escolhidos dois focos no desenvolvimento de um ensaio que é muito rápido. Incubações longas são de interesses de limites de ensaio, mas não para propósito de diagnóstico ou detecção. Foi verificado que biotinilar o anticorpo de captura e fixá-los em microesferas de estreptavidina foi mais fácil e gerou, marginalmente, resultados melhores. A combinação de biotinilar o anticorpo, melhorar a ligação e condições de lavagem e otimizar o número de microesfera levou a uma sensibilidade melhorada por um período de tempo. Em um ensaio de 10  $\mu$ L de solução suspeita dopada com BoNT/A, a sensibilidade é 16 pg (1,6 ng/mL) (FIG. 162). O ensaio inteiro, incluindo a adição de microesferas, ligação por dois minutos, captura magnética e lavagem de microesfera, adição de célula e medição de produção de luz, leva aproximadamente 6 minutos.

#### *Resumo*

Em resumo, foi desenvolvido um ensaio para toxina botulínica usando microesferas revestidas com anticorpos para capturar toxina solúvel. Essas microesferas revestidas com toxina são usadas para apresentar toxina imobilizada às células CANARY. Consideravelmente as microesferas facilitam a transferência de toxinas a partir de qualquer variedade

de matrizes incompatíveis de células em meio de ensaio. Isso permite a detecção de toxina no sangue, urina, swabs nasal, suco de laranja, leite, água e Triton-PBS algumas matrizes causam respostas diminuídas em ensaios de CANARY, particularmente aquelas que contêm concentrações elevadas de proteínas (plasma e leite). Essa inibição pode ser parcialmente superada mediante adição de sal para diminuir interações de proteínas não específicas. O ensaio foi otimizado para ser rápido, e pode detectar 16 pg (1,6 ng/mL) de BoNT/A 6 minutos. A sensibilidade poderia parecer ser dependente da afinidade do anticorpo de captura, mas o uso de anticorpos de afinidade mais elevada não melhora o limite de detecção. O aumento do tempo de incubação da etapa de captura de microesfera não resulta em uma melhor sensibilidade (menos que 0,32 ng/mL). Mesmo em matrizes difíceis pode detectar uma fração de um LD50 em 6 minutos.

#### *Desenvolvimento de Hardware para CANARY*

##### Materiais e Métodos

Ensaio de microesfera de Agente Magnético e Microesfera de Célula-B Magnética.

Microesferas que ligam células-B: Dynabeads® Mouse Pan B (B220) número de catálogo 114-41D foram usados sem modificação adicional.

Microesferas que ligam agente: Dynabeads® M280 Tosylactivated número de catálogo 142-03 foram funcionalizados com anticorpos de captura de acordo com as recomendações do fabricante.

Procedimento de ensaio: Incubar microesferas magnéticas (Dyna / número de cat. 142-03) foram revestidas

com anticorpos de agentes em tubo de 1,5 mL com amostra por 5 minutos a temperatura ambiente. Abaixar o agente capturado e a microesfera para o fundo do tubo com o ímã. Adicionar microesferas magnéticas de células-B (Dynal / número de cat. 114-41D) ao tubo e abaixá-las para o fundo do tubo mediante uma exposição por 10 segundos em um ímã forte de terra rara. Colocar o tudo em luminômetro e ler o sinal.

#### *Tiras de Fluxo Lateral*

10 Materiais:

Chumaço de amostra: chumaço de fibra de vidro Millipore tipo G041 / GFCP1 030 00. Chumaços de material absorvente ("Wick pads"): chumaços de amostra absorventes de celulose Millipore C082 / CFSP1 730 00.

15 Membrana de captura: Membrana polypro GH Pall de 0,45  $\mu\text{m}$  (nº. de cat. GHP4550001 / Pall).

#### Métodos

Montar as tiras de fluxo lateral como segue. Colocar um chumaço de material absorvente Millipore de 0,25 in. X 0,25 in. em uma fita adesiva. Aplicar uma membrana polypro GH Pall de 0,45  $\mu\text{m}$  de 0,4 in. X 0,1 in no topo do chumaço de material absorvente de forma que 1/3 da membrana esteja no topo do chumaço de material absorvente. Aplicar um filtro de fibra de vidro de 0,25 in. X 0,5 in à membrana polypro GH Pall.

25 Aqui são descritos hardwares de canal único capazes de realizar ensaios de CANARY otimizados. Foram adotados dois caminhos paralelos: (1) Desenvolvimento dos conceitos de projeto de costume para uma unidade única capaz de rodar e

analisar as amostras CANARY, e (2) examinar luminômetros COTS e minicentrífugas que podem ser modificadas, ou preferivelmente usadas sem modificação para realizar ensaios de CANARY. A consequência daquele processo foi a  
5 identificação de hardware COTS baratos que melhoram o desempenho e os procedimentos de ensaio de CANARY. A combinação ideal de hardware baseou-se no luminômetro FB12 de Berthold Detection Systems usado em conjunção com uma minicentrífuga VWR ajustada com um rotor de costume para  
10 possibilitar rodar até oito amostras de CANARY na configuração ideal.

O procedimento para usar o sensor de canal único começa com um pré-rodagem de ~ 2 minutos a > 6.000 RCF em uma microcentrífuga convencional de rotores horizontais  
15 (swing-bucket), se disponível, ou na microcentrífuga VWR. Uma gotícula de células B foi adicionada a amostra, colocada na microcentrífuga e girada por 5 segundos. Existe tempo suficiente antes do sinal de pico para transferir a amostra para o luminômetro para leitura de sinal e  
20 identificação de CANARY. Todo o procedimento de teste de CANARY pode ser completado em 3 minutos possibilitando que esse sensor de canal único operado por um usuário único processe até 25 amostras por hora com pré-rodagens de amostras em paralelo.

25       Desenvolvimento de Sensor de 16 Canais

Nessa forma mais simples, uma medição de CANARY consiste em preparar uma amostra em um tubo transparente, introduzir uma alíquota de células B preparadas de forma especial no tubo, conduzir as células B para o fundo do

tubo usando um girador centrífugo rápido, e medir a produção de luz do tubo com um sensor de contagem de fótons. No laboratório, a maioria das medições de CANARY foi feita seqüencialmente, uma amostra de cada vez; No  
5 sensor de identificação bioaerosol BAWS/CANARY automatizado, quatro amostras são medidas simultaneamente, cada amostra tendo seu próprio canal de coleta de luz. Cada canal de coleta de luz consiste tipicamente de um sensor de fóton, fonte de alimentação de voltagem elevada, um  
10 circuito de discriminação de pulso e, possivelmente, um contador digital. O primeiro sistema requer mais tempo, enquanto que o último requer hardware mais complexo (e caro).

Uma nova aproximação que reduziu o tempo para medir  
15 amostras múltiplas (embora preservando as exigências mínimas do hardware) foi testada com êxito. Um sensor de leito de teste foi fabricado, o que permitiu a medição simultânea de até 16 amostras usando um canal de recolhimento de luz único. O sensor consistia de um rotor  
20 que mantinha 16 tubos de 1,5 mL horizontalmente, igualmente distribuídos em torno de sua circunferência, e acionado por um motor de velocidade variável em torno do eixo vertical. Um único elemento de detecção de fótons fixado (nesse caso, um PMT) foi posicionado na superfície plana do rotor, logo  
25 adiante da rota dos tubos durante a rotação. Desse modo, cada um dos tubos foi, seqüencialmente e respectivamente, posto em proximidade imediata do PMT, permitindo que a produção de luz fosse amostrada em cada passagem.

Adicionalmente, um interruptor ótico consistindo de uma fonte ótica (um LED infravermelho) e um detector (um fototransistor) foram usados para controlar a contagem de fótons detectados e a reorganização de dados em 16 campos, cada um associado com uma amostra específica.

Uma medição única consiste de: 1. Preparar 16 amostras (e/ou controles em tubos individuais de 1,5 mL; 2.introduzir uma alíquota de células B em cada um dos tubos; 3. Instalar os tubos em um rotor situado em uma caixa preta; 4. Localizar as células B no fundo dos tubos usando um girador centrifugo rápido 5 (segundos) em alta RCF (~ 2000 g); 5. Reduzir a velocidade do rotor para 60 rpm enquanto perdurar a medição (1-2 minutos), cada tubo sendo amostrado uma vez a cada segundo; 6. Gerar uma série de tempo de contagem de fóton para cada amostra para exibição e/ou entrada em um algoritmo de computador para avaliação.

Os testes foram rodados analisando as características da coleção de sinais a partir das amostras lidas enquanto giravam para determinar quão completamente o rotor de 16 locais no de leito de teste poderia ser cheio antes que os sinais comesçassem a se sobrepor. Com o rotor completamente cheio, todas as amostras produziram sinais com sinalização para razões de ruídos comparáveis com aqueles observados no sensor de canal único, e nenhuma diafonia perceptível de luz emitida entre os canais foi observada caso confusão suficiente fosse provida para limitar os ângulos transmitidos pela luz. Um exemplo de dados a partir do de leito de teste com 16 canais mostra um LOD comparável a

aquele do método de tubo único. Embora esse sensor meça 16 amostras na medida em que são projetadas, grandes números de amostras são possíveis, ainda que o tamanho físico e as estatísticas de amostragem sejam os parâmetros que ditarão, no final, os limites práticos.

O formato rotativo foi introduzido no projeto para o sensor protótipo de 16 canais portáteis. O objetivo inicial do projeto foi incorporar o hardware necessário para a rodar e ler ensaios de CANARY em uma unidade portátil autocontida, pequena com menos de 12 polegadas na dimensão mais longa. Adicionalmente, providências foram tomadas para assegurar que o consumo de energia foi baixo o suficiente para possibilitar a inclusão de uma bateria no anexo para operação alimentada por bateria. Esses objetivos foram consumados mediante a construção de componentes de sensor em uma caixa de transporte de COTS pequenos que foi fechado para luz e água, e mediante o uso de um motor menor e controlador que foi capaz de rodar o rotor usando uma fonte de potência DC de 24 V.

Desenvolvimento de Sensor Portátil: Desenvolvimento de Ensaio Simplificado

Um sensor portátil compacto específico em aplicações clínicas, rápidas ("point-of-care") e de organização direcionada é de particular interesse. Foi focada a caracterização do desempenho de procedimentos alternativos de ensaio que podem reduzir ou eliminar as exigências para as etapas de centrifugação, uma vez que eles são atualmente os acionadores primários de consumo de energia e complexidade do instrumento. Foi avaliado experimentalmente

um número de aproximações direcionadas a formatos de amostra que empregam exigências de centrifugação reduzida, canais microfluídicos, montagens de fluxo lateral, filtração ou captura magnética de microesfera. Dessas aproximações, a redução das exigências de centrifugação, uso de montagens de fluxo lateral, e captura magnética de microesfera, são descritos em mais detalhes abaixo.

Formato padrão com etapas de centrifugação reduzida. Sinais em resposta a elevadas concentrações de agentes foram observados sem etapas de centrifugação, assim para caracterizar trade-offs de desempenho que resultariam, foi realizada uma série de experimentos usando permutações de centrifugação diferentes. Os experimentos indicaram que reduzindo os tempos de centrifugação e de ensaio (de ~ 3 minutos por ensaio para ~ 1 minuto por ensaio) reduzirá a sensibilidade para aproximadamente um ordem de magnitude.

*Formatos de fluxo lateral.* Foi caracterizado o desempenho de ensaio de CANARY em dispositivos com materiais de filtro e de drenagem de camada para realizar transporte de fluido de amostra e localização de antígeno sem centrifugação. A construção básica dos dispositivos, bem como as ilustrações que demonstram sua habilidade para localizar partículas dimensionadas de esporo, são mostradas nas FIGS. 184 e 185. A FIG. 186 mostra os sinais resultantes de CANARY para os ensaios centrífugos padrão e ensaios de fluxo lateral usando o mesmo agente e amostra de célula.

*Ensaio duplo de microesfera magnética.* Foi caracterizado um ensaio que tirou proveito de dois

conjuntos de microesferas magnéticas. Um conjunto é específico para as células B de CANARY, enquanto que o outro conjunto é específico para um agente particular. Na FIG. 187, um ensaio de CANARY padrão foi corrido ao longo de um ensaio duplo de microesferas usando as mesmas séries de células B e agente de diluição. Microesferas magnéticas específicas para *Y. pestis* foram misturadas com uma série de diluição de agente *Y. pestis* por 5 minutos. Após 5 minutos as microesferas magnéticas foram abaixadas para o fundo do tubo de ensaio junto com alguns *Y. pestis* ligados, e o sobrenadante foi removido. As células B marcadas magneticamente foram, então, adicionadas à amostra e abaixadas para o fundo do tubo. O agente de localização e células B com microesferas magnéticas, desse modo, demonstraram, em grande parte, fornecer sensibilidade similar àquela da centrifugação.

#### Desenvolvimento de Hardware de Sensor Portátil

O desenvolvimento de Hardware de sensor portátil começou com o projeto de um cartucho apto para um ensaio de CANARY único que pode ser realizado sem centrifugação. O cartucho foi projetado para conter um swab que possui um ímã pequeno, mas poderoso, em sua ponta, bem como uma cápsula de células B que estão fixadas a microesferas magnéticas (FIG.188). Após usar o swab para amostrar uma superfície, isso seria introduzido na cápsula contendo células B, e o ímã arrastaria as células ligadas a microesferas para o antígeno na superfície do swab. Então, o cartucho inteiro seria deslizado em um luminômetro alimentado por bateria, adaptado especialmente para

registrar a emissão de luz. Esse sensor portátil poderia ser usado em campo para determinar a exposição de uma pessoa ou superfície a um patógeno específico. A base lógica para esse projeto foi baseada em vários fatores. Foi

5 demonstrada a habilidade para substituir centrifugação por microesferas magnéticas mediante o uso de um ímã para arrastar células B ligadas a microesferas para o antígeno em uma amostra líquida (que foi preparada por centrifugação). Também foi mostrado que células B podem ser

10 empacotadas em cápsulas, já que elas estariam no cartucho, e também podem ser refrigeradas por semanas ou mantidas a temperatura ambiente por 48 horas sem perder a sensibilidade. Finalmente, embora os ímãs possam ter efeitos adversos no funcionamento de um tubo

15 fotomultiplicador, foi possível mostrar que a distância entre o swab magnético e o tubo fotomultiplicador no luminômetro pode ser controlada para impedir esses efeitos adversos. Os experimentos iniciais mostraram que células B ligadas a microesferas, arrastadas para um ímã esférico de

20 neodímio na ausência de antígeno, emitem um sinal de luz transiente. Isso é muito provavelmente devido ao estresse mecânico das células. Várias reparações possíveis foram identificadas incluindo: o uso de ímãs mais fracos (ímãs de neodímio são muito fortes); ímãs "ajustados" (um material

25 magnético na ponta do swab, magnetizado por um ímã de neodímio montado mais distante do corpo do swab); e um ímã retrátil (que pode ser retirado imediatamente após as células B terem sido atraídas para a superfície do swab).

A complexidade de processamento e manipulação magnética foi removida do artigo de consumo onde isso faria subir o custo de operação. A variação dos componentes para a amostra magnética e manipulações de célula no dispositivo de leitura portátil adiciona pouco ao custo total do dispositivo. Além disso, essa aproximação possibilita que os ensaios sejam realizados em tubos de microcentrífuga de COTS e assegura confiabilidade e sensibilidade máxima. Com base nessas vantagens, um luminômetro portátil com característica que possibilitam a manipulação de ensaio magnético na placa ("onboard") foi desenvolvido. O sensor óptico e a eletrônica de suporte são baseados naqueles verificados em um luminômetro disponível comercialmente feito por Berthold Detection Systems, o mesmo fabricante que produz o luminômetro COTS que foi incorporado no sensor de CANARY de canal único. O projeto resultante é mostrado na FIG. 189. O sensor completo com base nesse projeto é mostrado na FIG. 190.

O sensor de CANARY portátil (FIG. 190) retrata um PMT orientado com o fotocatodo  $< 1$  mm a partir do fundo do tubo de ensaio, uma tela de leitura com mesa de toque, um pacote de bateria recarregável, e uma porta de amostra móvel. A porta de amostra contém um ímã de terra rara posicionado de modo que a inserção de um tubo como mostrado na FIG. 189 resulte em co-localização do alvo capturado e células B marcadas magneticamente. O procedimento de ensaio começa com a adição de microesferas magnéticas para a amostra, seguida de mistura e incubação por 5 minutos. A suspensão amostra/microesfera é, então, colocada em um suporte de

tubo magnético na porta por 1 minuto para localizar o alvo de captura no fundo do tubo. A amostra que foi empobrecida de alvo é removida e substituída com tampão de ensaio contendo celular B, e o tubo é retornado para o suporte magnético. Após 5 segundos, o tubo é colocado em posição de leitura na porta, a porta é fechada e os sinais PMT são registrados.

Desse modo, foi desenvolvido um sistema para produção de células B construídas geneticamente que serve como sensor para a identificação rápida de patógenos e toxinas. Os ensaios desenvolvidos usando essas células demonstram a melhor combinação de velocidade e sensibilidade conhecidas (< 50 partículas de *Y. pestis* mortas em < 3 minutos, com uma taxa de alarme falsa de 0,4% com amostras de laboratório), e porque as células B são auto-replicantes, o custo de materiais é muito baixo. Além das 24 linhagens de célula-B construídas geneticamente geradas, incluindo febre do vale do Rift, vírus da Dengue e outras de significância para diagnósticos clínicos, foi produzida uma linhagem de células CANARY cuja especificidade pode ser construída em semanas ao invés de meses. Foram desenvolvidos ensaios de 5 minutos para amostras clinicamente relevantes, demonstrando detecção 50 cfu de esporos de *B.anthraxis* a partir de swabs nasais, 500 cfu de *C. trachomatis* EBs na urina, e 1000 cfu de *Y. pestis*/mL de sangue total. Também foi demonstrado que ensaios de CANARY podem ser multiplexados mediante a combinação de até três linhagens de células em um ensaio único, ou mediante a construção de células que respondem a mais de um patógeno. Alternativamente, foi mostrada a

produção de células que emitem comprimentos de onda de luz diferentes, possibilitando um ensaio único que pode distinguir entre dois ou mais patógenos.

Foram aumentadas as capacidades de CANARY para incluir  
5 toxinas de proteína, demonstrando detecção em níveis tão baixos quanto 16 pg (1,6 ng/mL) de toxina Botulínica A em um ensaio de 6 minutos. Dezesesseis picogramas de toxina representam aproximadamente 0,000029 (1/34,370) de LD50 por inalação para uma pessoa de 55 Kg (120 lb). Isso é  
10 aproximadamente 0,00023 x LD50 por injeção, e 0,00000029 x LD50 por ingestão. Nesse nível de sensibilidade o ensaio pode detectar aproximadamente 1 LD50 presente em 34 litros de fluido. Isso é pouco claro se essa sensibilidade fosse suficiente para diagnóstico de BoNT/A usando amostras de  
15 soro de pacientes (dados publicados sobre concentrações de soro estão em falta), mas isso certamente seria um excelente método de seleção para contaminação de alimentos, material aerossolizado ou exposição de inalação (swabs nasais).

20 Embora o ensaio de CANARY possa ser realizado em um formato de canal único usando vários pedaços do equipamento COTS, foi desenvolvido um sensor de 16 canais com um motor de rotação integrado e PMT que pode processar aproximadamente 100 amostras/hora enquanto mantendo o LOD  
25 ideal de 50 cfu/pfu de bactérias ou vírus grandes. Também foi desenvolvido um sensor portátil que utiliza uma aproximação magnética dupla, não centrífuga.

O biosensor com base em célula B de CANARY explora um sistema altamente desenvolvido para identificação de

patógenos que provê várias vantagens diante de outras tecnologias de identificação. O biosensor a base de célula B de CANARY utiliza um sistema altamente desenvolvido para identificação de patógeno que provê várias vantagens sobre  
5 outras tecnologias de identificação. Com CANARY é possível prover identificação em aproximadamente 5 minutos, e com aqueles patógenos grandes o suficiente para serem concentrados em uma microfuge, foi demonstrado um nível de sensibilidade que se aproxima do PCR. Em comparação,  
10 imunoenaios do estado da técnica requerem pelo menos 14 minutos e tem um maior limite de detecção ( $6 \times 10^4$  cfu ou  $6 \times 10^6$  pfu). Embora o PCR seja extremamente sensível (1 a 5 cfu), altamente específico e se aproveite de avanços tecnológicos que reduziram o tempo para amplificação e  
15 detecção de sinal, o ensaio leva pelo menos 7 min. (tipicamente 20 - 30 min.), não incluindo o tempo requerido para extrair e purificar o DNA. Aplicações que se beneficiariam de uma tecnologia tal como CANARY incluem diagnósticos laboratoriais rápidos (point-of-care) para  
20 doenças onde a taxa de retorno para o tratamento é baixa, mas o impacto social é elevado, tais como, doenças transmitidas sexualmente. Além disso, CANARY seria valioso para detecção pré-sintomática a partir de swabs nasais como conseqüência de um ataque de guerra biológica, detecção de  
25 patógenos de agricultura de porta de entrada, ou seleção suprimentos de alimentos perecíveis. De fato, CANARY é um método sensível rápido, que pode possibilitar a detecção e identificação de patógenos altamente infecciosos em qualquer ajuste crítico de tempo.

**EXEMPLOS DE MÉTODOS DE ENSAIO E CONSTRUÇÃO DE CÉLULA**

## A. Métodos de Construção de Células:

Células M12g3R foram mantidas a 37°C em uma atmosfera umidificada de CO<sub>2</sub> a 5% em RPMI 1640 suplementado com soro bovino fetal a 10%, piruvato de sódio 1 mM, glutamina-L 2 nM, 100 µM de aminoácidos não essenciais, 50 µM de mercaptoetanol-2, 50 µg/mL de estreptomicina, 50 U/mL de penicilina e 250 ng/mL de anfotericina B (Life Technologies). Células foram transfectadas com pCMV.AEQ.IRES.NEO por meio de eletroporação (270 V, 950 µF) e selecionadas em 1 mg/mL de G418 por duas semanas. Clones resistentes de G418 foram selecionados para a resposta a anti-IgM. Aqueles clones com o maior aumento na emissão de fóton na reticulação da superfície de IgM foram usados em transfecção subsequente para gerar linhagens de células B específicas para patógenos particulares. A expressão de superfície de anticorpos com especificidade construída é efetuada por co-transfecção (por meio de eletroporação) com vetores de expressão para cadeias pesadas e leves, bem como com um que codifica um gen que confere resistência para a puromicina. Clones e pools resistentes a puromicina foram selecionados com base em suas respostas ao antígeno. O vetor de expressão de cadeia leve, VKExpress, contém a região constante para o gene de humano Kappa a jusante de um local de clonagem múltipla (MCS), sob controle do promotor de fator 1-α (EF-1α) de alongação humano. O vetor de cadeia pesada foi gerado mediante a modificação de pDisplay (Invitrogen), retendo o promotor de citomegalovirus (CMV) e a seqüência líder, mas substituindo

o domínio de transmembrana receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) com o gene para a região constante de murina IgM ligada a membrana e removendo ambas as identificações em cada lado do MCS. Os sítios de restrição apropriados são adicionados a regiões variáveis de anticorpos usando PCR e a seqüência de todos os produtos de PCR antes da clonagem no construto de expressão. As regiões variáveis usadas para produzir o anticorpo recombinante foram clonadas ou a partir de cDNA ou a partir de hibridomas usando Transcrição-Reversa (TR) com iniciadores de oligonucleotídeos randomizados e PCR. O RNA foi extraído com reagente Triazol (Life Technologies), de acordo com recomendações do fabricante, e a primeira síntese de cadeia foi realizada usando o kit Retroscript (Ambio). PCR foi realizado usando conjuntos de iniciadores projetados para se anelarem as seqüências líderes ou de cadeias leves ou pesadas [S. T. Jones e M. M. Bending, Bio/Technology 9, 88 (1991)] na extremidade 5', e as regiões constantes de Kappa de murina ou IgG2 na extremidade 3'.

*B. Resposta de Célula B Bioluminescente ao FMDV:]*

A linhagem de célula B M12g3R, transfectada de forma estável com plasmídio pCMV.AEQ.IRES.NEO e vetores de expressão para um anticorpo recombinante que reconhecem a cepa A12 de FMDV, foram preparados para o ensaio de luminescência com segue: 1. Preparação de células 24 horas após o descongelamento é crítica para a confiabilidade e estabilidade máximas.

A etapa de congelamento/descongelamento aumenta a resposta das células B para 100 vezes. No dia 2,  $10^6$  células foram incubadas a temperatura ambiente por 2 horas em meio de ensaio [meio independente de  $\text{CO}_2$ , FBS a 10%, 50  $\mu\text{g/mL}$  de estreptomicina, e 50 U/mil de penicilina, 250 ng/mL de anfotrecina B (Life Technologies)] com 50  $\mu\text{M}$  de coelenterazina (Molecular Probes, Eugene, Oreg.) cobertas com lâmina de metal, lavada duas vezes e ressuspensas em meio de ensaio em um concentração final de  $5 \times 10^5$  células/mL. As células foram deixadas girar durante a noite a temperatura ambiente em tubos de 1,5 mL de microcentrífuga e ensaiadas 15-20 horas mais tarde. Para o ensaio, 25  $\mu\text{L}$  de células foram misturados com antígeno (5  $\mu\text{L}$  de cepa wt A12pRMC35 a  $1,4 \times 10^8$  pfu/mL, 10  $\mu\text{L}$  de variante A12, B2PD.3, a  $7,5 \times 10^7$  pfu/mL) e a resposta medida em um luminômetro (Lumat LB 9507, Perkin Elmer).

*C. Ensaio de Bioluminescência com Bactérias e Vírus grandes:*

O dispositivo de sensor e os métodos podem ser usados para detecção rápida de bactérias, bem como patógenos virais. Linhagens celulares foram construídas para responder a bactéria *Francisella tularensis*, o agente etiológico da tularemia. Entretanto, quando ensaiadas usando o mesmo protocolo com vírus VEE e FMD, o sinal é lento e quase indistinguível do sinal do de base, indicativo de baixas taxas de interação entre as células B e o antígeno (0s de pré-rodagem/0s de rodagem). Experimentos anteriores realizados com simuladores de microesferas revestidas com antígeno indicaram que a

sensibilidade e a velocidade podem ser aumentadas mediante a concentração de antígeno e células B (dados não mostrados), então o luminômetro foi reconfigurado para incluir uma centrífuga posicionada acima do tubo 5 fotomultiplicador (PMT). Quando o agente e as células são misturados juntos e, então, concentrados mediante centrifugação por 5 segundos, o sinal é melhorado e a resposta é mais rápida (0s pré-rodagem/5s de rodagem). Resultados otimizados são observados quando o *F.tularensis* 10 de centrifugação lenta é centrifugado antes da adição de células (60s de pré-rodagem/5s rodagem). Esse formato assegura que um número grande de células vem em contato físico com o antígeno dentro de uma curta disposição de tempo, por meio disso, provendo um maior melhoramento na 15 sensibilidade e velocidade. Após otimização adicional do protocolo de ensaio, é possível detectar agora níveis tão baixos quanto 60 unidades formadoras de colônia (cfu) de *F.tularensis* em menos de 3 minutos, incluindo o tempo que isso leva para pré-rodar o agente, mas sem ver nenhuma 20 resposta da *Yersinia pestis* inativada, a bactéria que causa a praga. O limite de detecção foi confirmado com duas outras fontes de *F.tularensis* inativada, e uma cepa diferente (dados não mostrados). Além disso, o dispositivo de sensor exhibe uma faixa ampla de sensibilidade, 25 detectando concentrações variando em uma faixa superior a 7 ordens de magnitude.

As células B foram preparadas como descrito acima. 50 µL contendo a quantidade indicada de *Y. pestis* ou *F. tularensis* foram centrifugados por 60 s a 6500 x g, então

20  $\mu$ L de células foram adicionadas e giradas por 5 s adicionais no luminômetro centrífugo. Fótons foram detectados com um tubo fotomultiplicador HC-125 Hamamatsu e o sinal foi monitorado com um contador de fótons controlado por um Standford Research Systems SR400.

#### **EXEMPLO DE DETECÇÃO DE ÁCIDO NUCLÉICO**

Caracterização de anticorpos de digoxigenina de células emissoras

Plasmídios que decodificam um anticorpo (Daugherty, et al. (1998) Construção de Proteínas 11 (9): 825-832) contra proteínas foram introduzidos dentro de células emissoras, e estas células foram selecionadas usando proteínas (BSA) quimicamente conjugadas para digoxigenina (Dig-BSA). Doze pools independentes foram selecionados resultando em 12-24 linhagens celulares independentes. O primeiro experimento testou se estas células podem detectar antígenos de digoxigenina reticulado por DNA (Dig-DNA). Três tipos de Dig-DNA comerciais foram testados por reatividade com anticorpo Dig expressando células CANARY (FIGS. 26A - C): DNA de plasmídios com uma digoxigenina fixou todos os pares de 20 bases (FIG. 26A); marcadores de peso molecular de DNA com digoxigenina fixaram todas as 200 bases (FIG. 26B); e os marcadores de peso molecular de DNA com uma digoxigenina fixou cada extremidade (FIG. 26C). Cada um destes padrões estimulou as células emissoras para um grau variado, com a maioria das respostas sendo para o DNA de plasmídio Dig-marcados. O fato de que os antígenos estarem espaçados em média por 20 bases isoladamente estimula as células 100 vezes mais (por base de digoxigenina, e não por base de

micrograma de DNA) que os antígenos espaçados por 200 bases isoladamente é uma indicação de que o espaçamento das 200 bases é muito maior que a distância para estimular uma resposta ideal. Para estimular a cascata intracelular resultante da distribuição de cálcio e produção de aequorina leve, anticorpos adjacentes podem ser imobilizados próximos o suficiente de cada outro para iniciar a reação dentro da célula.

Também foi observado que a centrifugação logo antes da medição de produção de luz, que é rotina na detecção de antígenos solúveis e insolúveis usando o CANARY tradicional, pode realmente diminuir a sensibilidade de CANARY contra o antígeno Dig-DNA solúvel. No experimento mostrado (FIGS. 27 A e 27B), centrifugando as células através da solução de DNA parece diminuir de detecção de um fator aproximadamente de 10. Este resultado pode refletir diferenças entre a detecção de DNA e a detecção de outros antígenos não sedimentáveis.

Detecção de sondas de oligonucleodídeos hibridizados usando células emissoras.

Este ensaio foi projetado para detectar a hibridização de sondas marcadas com digoxigenina (Dig) para DNA alvo. O DNA alvo para esses experimentos foi derivado do phagemid pBluescript II. Esse phagemid circular longo de 3100 pares de base pode ser induzido para fazer DNA de cadeia dupla (dsDNA) ou também duas cadeias únicas de DNA (ssDNA). Essa duas cadeias ssDNA são designadas cadeia (+) ou cadeia (-). Dez sondas de oligonucleotídeos marcadas com Dig que se ligam especificamente à cadeia (+) foram projetados:

Oligo número	Seqüência de DNA	Posição de base de Phagemid	Tm
1	GCAACGTTGTTGCCATT (SEQ ID NO: 1)	2269-2285	56.0
2	TACAGGCATCGTGGTGT (SEQ ID NO: 2)	2288-2304	53.3
3	GCTCGTCGTTTGGTATGG (SEQ ID NO: 3)	2309-2326	57.3
4	TCATTCAGCTCCGGTTC (SEQ ID NO: 4)	2328-2344	55.0
5	ACGATCAAGGCGAGTTAC (SEQ ID NO: 5)	2348-2365	53.1
6	GATCCCCCATGTTGTGC (SEQ ID NO: 6)	2368-2384	57.7
7	AAAGCGGTTAGCTCCTTC (SEQ ID NO: 7)	2388-2405	54.3
8	TCCTCCGATCGTTGTCA (SEQ ID NO: 8)	2408-2424	56.5
9	GTAAGTTGGCCGCAGTG (SEQ ID NO: 9)	2428-2444	55.7
10	TCACTCATGGTTATGGCA (SEQ ID NO: 10)	2448-2465	53.5
NEG3	CCATACCAAACGACGAGC (SEQ ID NO: 11)	2326-2309	57.3

Oligonucleotídeos são numerados na ordem de suas localizações ao longo do DNA phagemid pBluescript. É mostrado para cada um, a seqüência de DNA do oligonucleotídeo, a posição da seqüência no phagemid e a temperatura de fusão (Tm) daquele oligonucleotídeo (uma aproximação da afinidade de ligação). A faixa pequena nas Tm(s) para esses oligonucleotídeos indica que eles têm, cada um, características de ligação similares.

Cada um desses oligonucleotídeos possui uma molécula de digoxigenina (Dig) fixada a um primeiro resíduo, e cada um possui comparáveis características de ligação de DNA alvo como refletido por suas temperaturas de fusão (Tm) similares calculadas. A hibridização desse conjunto de 10 oligonucleotídeos marcados com digoxigenina a cadeia (+) do DNA alvo rende uma extensão de 200 bases de DNA de cadeia dupla com uma molécula Dig a cada 20 bases. As 2900 bases restantes do plasmídeo permanecem de cadeia única.

Essa coleção de antígenos de digoxigenina imobilizados reticula anticorpos de digoxigenina na superfície de células emissoras e estimulam produção de luz.

O 11° oligonucleotídeo (NEG3) é um controle. O NEG3 foi projetado para se ligar diretamente ao oligonucleotídeo número 3, produzindo um pedaço curto de dsDNA de 20 longos nucleotídeos com um Dig único em cada extremidade. As células emissoras que expressam um anticorpo de digoxigenina foram capazes de detectar 80 fentomoles de oligonucleotídeo (FIG. 28). Esse controle demonstrou que as condições de hibridização escolhidas foram pelo menos suficientes para suportar a ligação de dois oligonucleotídeos dentro dessa faixa de  $T_m$ . Mais consideravelmente, esse controle demonstrou que a ligação entre 20 bases de DNA complementar é suficientemente forte para reticular anticorpos e induzir um sinal de células emissoras.

A hibridização oligonucleotídeo-oligonucleotídeo de forma extremamente rápida (FIG. 29). O oligonucleotídeo NEG3 foi adicionado a solução de hibridização, seguido pelo oligo3. A solução foi imediatamente diluída no meio, as células emissoras adicionadas, e o local de reação foi no luminômetro (tempo decorrido para adição de oligo3 foi 15 segundos). Esse protocolo de hibridização abreviado não afetou drasticamente a sensibilidade do ensaio (comparar FIG. 29 com FIG. 28).

Em seguida, oligonucleotídeos marcados com Dig múltiplo foram hibridizados para alvo de DNA de cadeia única. Esse complexo foi testado para avaliar sua

habilidade para estimular células emissoras. A FIG. 30 mostra uma série de hibridizações de concentrações diferentes de sonda de oligonucleotídeo-Dig para uma dada quantidade de ssDNA. A razão de ssDNA: a sonda de oligonucleotídeo que gera o melhor sinal nesse experimento estava entre 1:2 e 1:4. Em concentrações mais elevadas de sonda, os oligonucleotídeos marcados com Dig não ligados pareceram inibir a sinalização. Nesses experimentos 0,63 pmoles de oligonucleotídeos funcionaram bem sob muitas das condições testadas. Uma curva de dose-resposta dá um limite de detecção para DNA de cadeia simples de aproximadamente 50 ng, ou aproximadamente 50 fmoles (FIG. 31). É importante observar que o DNA de cadeia (-) não foi detectado em qualquer um desses experimentos, indicando que a hibridização de oligonucleotídeos marcados com Dig e com subsequente sinalização de células emissoras é dependente da seqüência de DNA alvo.

A temperatura e constituintes de tampão afetam a hibridização de oligos-Dig para DNA alvo. A hibridização entre 47 °C e 51 °C ou em PBS (FIG. 32A) ou TBS (FIG. 32B) gerou a resposta maior. A hibridização realizada em temperaturas mais elevadas ou mais baixas diminui a amplitude de sinal. Mudanças nos constituintes de tampão afetarão, obviamente, a temperatura de hibridização ideal.

#### 25 Captura de DNA Alvo

Oligonucleotídeos marcados com biotina foram ligados a superfície do ímã revestido com estreptavidina e microesferas não magnéticas. Essas oligos "capturas" são projetadas para se ligarem ao DNA alvo em uma posição bem

distante do local dos oligonucleotídeos marcados com Dig. A  
ligação de DNA alvo a um suporte sedimentável permitirá a  
lavagem mais extensa do DNA antes da adição de células  
emissoras e melhorará a sensibilidade do ensaio. Uma  
5 estratégia para sedimentação do DNA alvo é mostrada na FIG.  
33. Nesse esquema, um oligonucleotídeo de captura marcado  
com biotina é fixado ou a poliestireno revestido com  
estreptavidina ou a microesferas magnéticas.  
Oligonucleotídeos marcados com digoxigenina são  
10 hibridizados ao alvo, e o complexo foi sedimentado mediante  
a centrifugação ou aplicação de um campo magnético. As  
células emissoras são, em seguida, ressuspensas e  
sedimentadas com as microesferas, e o tubo de reação  
colocado em um luminômetro. Os efeitos de sedimentação na  
15 detecção de DNA alvo são mostrados na FIG. 34. Nesse caso,  
o LOD é melhorado para a faixa de atomol elevada quando  
comparada com resultados típicos nos quais o DNA não é  
sedimentado. A adição de um reagente de bloqueio comercial  
(Roche Applied Science N° Cat. 1 096 176) melhora mais o  
20 sinal. A FIG. 35 mostra o resultado da adição de  
concentrações diferentes de agente de bloqueio durante a  
etapa de hibridização/captura. Nesse experimento, a adição  
de reagente de bloqueio entre 1% e 10% melhorou o sinal  
para a razão de base em todas as concentrações de alvo  
25 testadas.

#### CÉLULAS EMISSORAS DE FATOR Fc

Os receptores Fc são uma família de proteínas expressas em membranas que se ligam a anticorpos ou complexos imunes. Elas são expressas em várias células

hematopoiéticas incluindo monócitos e macrófagos. Existem várias subclasses de receptores Fc incluindo o Receptor Fc gama I (FcγRI), um ligante de afinidade elevada de anticorpo solúvel. O FcγRI se liga a região constante (porção Fc) da Imunoglobulina G (IgG) deixando a região que liga antígeno livre. A reticulação do receptor ligado a anticorpo por antígeno específico inicia o caminho de sinalização que estimula a distribuição de cálcio.

A linhagem celular de macrófago humano, U937, contém FcγRI endógeno. O tratamento dessas células com FcγRI aumenta a expressão do FcγRI, como visto na FIG. 36A. Células de U937 transfectadas com plasmídeo de expressão de aequorina produzem aequorina funcional demonstrado mediante o tratamento dessas células com ionomicina, um ionóforo de cálcio. Isso causa uma elevação transiente e rápida de cálcio que estimula a aequorina para emitir luz, como visto na FIG. 36B. As células U937 foram então testadas para determinar se a aequorina seria estimulada pela elevação de cálcio iniciada mediante a reticulação de receptores Fc. As células U937 foram incubadas com IgG humano por 15 minutos a temperatura ambiente. As células foram lavadas para remover IgG não ligado e tratadas com IgG caprino anti-humano. A rápida elevação de cálcio foi observada, como mostrado na FIG. 36C.

Os experimentos demonstraram que células U937 podem ser "construídas" rapidamente para responder a vários simuladores ou patógenos diferentes. As células U937 foram tratadas por 24 Horas com IFN (200 ng/mL) para aumentar a expressão de FcγRI endógeno, e preparadas para o ensaio de

célula emissora. As células foram incubadas com os seguintes anticorpos: de rato anti-esporo de *B. anthracis* (FIG. 37A), policlonal de coelho anti-esporo de *B. anthracis* (FIG. 37B), de rato anti-*F. tularensis* (FIG. 5 37C), ou de rato anti-*B. subtilis* (FIG. 37D). As células foram, então, usadas no ensaio padrão onde foram detectados somente 1.000 cfu de esporos de *B. anthracis* com o anticorpo monoclonal e 10.000 cfu de esporos com o anticorpo policlonal de coelho, bem como 10.000 cfu de 10 esporos de *F. tularensis* e 1,000 cfu de *B. subtilis*.

O próximo conjunto de experimentos demonstrou que a especificidade do ensaio é determinada pelo anticorpo que é usado. Células U937 foram incubadas com anticorpos de rato anti-*F. tularensis* e foram testadas para suas respostas a 15 105 cfu de esporos de *B. anthracis*. Como mostrado na FIG. 38A, as células não responderam a *B. anthracis*, mas responderam a 106 cfu de *F. tularensis*. Alternativamente, células carregadas com anticorpos de rato anti-esporo de *B. anthracis* não respondeu a *F. tularensis* mas respondeu a 106 20 cfu de esporos de *B. anthracis*, como mostrado na FIG. 38B. Além disso, as células não mostraram qualquer resposta para 106 cju de *F. tularensis* na ausência de anticorpo anti-*F. tularensis*, como visto na FIG. 38C.

#### CANARY: DETECÇÃO RADIOLÓGICA

25 O instrumento de CANARY também pode ser usado para detectar materiais radiológicos. Medidas radiológicas podem ser feitas por adição de fluido de cintilação ao invés de células B, e medindo a luz emitida do fluido de cintilação em resposta ao decaimento radioativo. O Hardware de CANARY

mostrou detectar sinais de fontes de alfa, beta e gama, e estas medidas se comparam favoravelmente àquelas feitas usando contador de cintilação com base em laboratório (FIG. 163). Nesse experimento, quantidades iguais de tipos variados de emissores foram adicionadas a fluídos aquosos de cintilação comerciais. O tubo foi agitado para misturar, e colocado ou em um contador de cintilação comercial ou em um luminômetro CANARY de bancada. A saída de luz foi monitorada em um mesmo computador do tipo laptop usando um mesmo software como em um ensaio de CANARY normal. A resposta do hardware CANARY foi muito similar a resposta do contador de cintilação comercial.

Essa capacidade (adicionada àquela da detecção química e explosiva) torna os sensores de CANARY muito amplamente úteis, uma vez que um sensor pode ser feito de forma a detectar todos os materiais químico, biológico, radiológico, nuclear e explosivo (CBRNE) em uma variedade de matrizes (ar, líquido, limpador de superfície, pós, etc.). Ver FIG. 163. Quantidades iguais de variados materiais radiológicos cobrindo todos os três tipos de emissores (alfa, beta, e gama) foram analisados. A resposta de CANARY se compara favoravelmente a um instrumento comercial, com base em laboratório.

## MÉTODOS ADICIONAIS PARA DETECÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS E EXPLOSIVOS

Fundamentos: Proteínas que se ligam no Periplásmico

Os produtos químicos usados para agentes de guerra química e/ou explosivos (também referido aqui como "CWA/E") são muito pequenos para serem detectados por CANARY

mediante a ligação direta de anticorpo. Entretanto, as bactérias são bem guarnecidas para detectar e identificar nutrientes, muitos dos quais são produtos químicos pequenos na faixa de tamanho de CWA/E. CANARY pode explorar uma parte do caminho de detecção de nutriente de bactérias, e ser modificado para detectar CWA/E.

Bactérias são organismos móveis e, como tais, se movem ativamente em direção a nutrientes. Para determinar a localização dos nutrientes, as bactérias usam proteínas que se ligam no periplásmico (PBPs) para monitorar seu ambiente. Essa família de PBP possui muitos membros, cada um dos quais ligado a um nutriente específico. Usando cristalografia de raios-X, pesquisadores mostraram que a proteína se assemelha a uma armadilha de moscas Vênus, que consiste de 2 lóbulos conectados por uma junta. Os nutrientes se ligam na boca formada entre os 2 lóbulos e, em resposta a ligação dos nutrientes na "boca" da proteína, a proteína fecha (mais exatamente, esse estado de equilíbrio muda de modo que ele está predominantemente na conformação fechada na presença de alvo químico). Essa mudança de forma dramática é usada para direcionar o movimento bacteriano em direção aos nutrientes. Este e outros estudos de estrutura indicam que as PBPs usam relativamente poucos aminoácidos para se ligarem realmente a seus alvos. Através de modelo computacional, é possível prever como transformar esses aminoácidos de modo que uma PBP se ligue a um produto químico completamente diferente do seu alvo original, tal como, o TNT explosivo, o PMPA simulador de soman (ácido pinacolil metilfosfônico), e o

neurotransmissor serotonina ( Allert e colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:7907-7912 (2004); Looger e colaboradores, Computational design of receptor and sensor proteins with novel functions. *Nature* 423:185-190 (2003)).

5 Grandes quantidades dessas PBPs transformadas foram produzidas em bactérias, e mostraram se ligar fortemente e especificamente a seus alvos.

Usando técnicas padrão, a produção de uma proteína que liga CWA/E de alta afinidade pode ser projetada. Se  
10 necessário, o projeto pode começar com várias PBPs mães diferentes, projetando computacionalmente todas elas para se ligarem a um dado alvo, e testando as afinidades que resultam de cada. Para o exemplo 3, PBPs diferentes foram selecionadas como pontos de partida para desenvolver uma  
15 proteína de ligação para TNT: proteína que liga arabinose (ABP), proteína que liga histidina(HBP) e proteína que liga ribose (RPB).

Relatórios publicados mostram que anticorpos monoclonais podem ser prontamente feitos contra a forma  
20 fechada (alvo ligado) da HBP (Wolf e colaboradores, *J. Biol. Chem.* 269:23051-23058 (1994); Wolf e colaboradores, *J. Biol. Chem.* 271: 21243-21250 (1996)). Esses anticorpos se ligaram muito rápido a HBP em presença de histidina, quando a proteína estava predominantemente na conformação fechada.  
25 Então, na essência, a taxa de anticorpo que liga a proteína HBP é uma medida da concentração do alvo (histidina).

Todas as PBPs passam por grande mudança conformacional entre as formas fechada e aberta. Portanto, os anticorpos podem ser gerados contra a conformação fechada de cada PBP.

Observe também que os aminoácidos que são transformados para mudar a especificidade de uma dada PBP estão limitados ao bolso de ligação ("binding pocket"). Desse modo, espera-se que um anticorpo único contra forma fechada da RBP, por exemplo, também se ligará às formas fechadas dos mutantes RBP que se ligam a TNT ou PMPA. O mutante que liga TNT poderia ser posto no "canal 1" do sensor, e o mutante que liga PMPA no "canal 2", mas uma linhagem de célula CANARY única que reage contra a forma fechada da RBP pode ser usada para detectar alvos em ambos os canais 1 e 2. A identidade do alvo químico será conhecida porque um alvo de PBP específico, diferente é usado em cada canal do sensor. Isso significa que o sensor deve requerer linhagens de células CANARY mais menores que o número de produtos químicos que ele pode identificar, simplificando muito o desenvolvimento de reagentes para CWA/E adicional.

*Detecção Química por CANARY usando PBPs projetadas computacionalmente mediante a combinação de elementos individuais:* (1) Proteínas que se ligam no periplásmico foram projetadas computacionalmente para se ligarem a uma variedade de produtos químicos. Essas proteínas foram produzidas em bactérias, isoladas, e suas afinidades a novos alvos, incluindo TNT e PMPA, mediadas. (2) Essas PBPs passaram por mudanças conformacionais na presença de ligante que podem ser medidas usando anticorpos específicos para a conformação fechada. (3) CANARY demonstrou que a capacidade para se usar ligações de anticorpos para detectar proteínas em níveis de atomol. Portanto, o ensaio de CANARY pode ser adaptado para detectar PBPs na

conformação fechada (ver FIG. 164). Essa conformação fechada indicará a presença de CWA/E.

Na detecção de produtos químicos e explosivos no ar, existem pelo menos 2 métodos possíveis para amostragem de vapor. O primeiro é o de colisão, no qual o ar é borbulhado através do líquido, capturando vapores e particulados. Esse é um método testado no tempo para amostragens de ar. Uma estratégia de coleta alternativa é o de Extração em Fase Sólida (SPE) ou Microextração em Fase Sólida (SPME). Essa técnica aprisiona vapor diretamente do ar em resinas funcionalizadas, secas. Tipicamente essas resinas são eluídas usando calor ou solventes orgânicos.

#### EXEMPLO DE SENSOR COM 16 CANAIS

Uma nova aproximação que reduziu o tempo para medir amostras múltiplas (embora preservando as exigências mínimas do hardware) foi testada com êxito. Um sensor experimental foi fabricado para permitir a medição simultânea de 16 amostras usando um canal de recolhimento de luz único. O sensor consiste de um rotor que mantém 16 tubos de 1,5 mL horizontalmente, igualmente distribuídos em torno de sua circunferência, e é acionado por um motor de velocidade variável em torno do eixo vertical (FIG. 39). Um único elemento de detecção de fótons fixado (nesse caso, um PMT) é posicionado na superfície plana do rotor, logo adiante da rota dos tubos durante a rotação. Desse modo, cada um dos tubos é, seqüencialmente e respectivamente, posto em proximidade imediata do PMT, permitindo que a produção de luz seja amostrada em cada passagem.

Finalmente, um interruptor ótico consistindo de uma fonte ótica (um LED infravermelho) e um detector (um fototransistor) são usados para controlar a contagem de fótons detectados e a reorganização de dados em 16 campos, cada um associado com uma amostra específica.

Uma medição única consiste de:

1. Preparar 16 amostras (e/ou controles) em tubos individuais de 1,5 mL;
2. Introduzir uma alíquota de células emissoras em cada um dos tubos;
3. Instalar os tubos em um rotor situado em uma caixa preta;
4. Localizar as células emissoras no fundo dos tubos usando um girador centrífugo rápido 5 (segundos) em alta RCF (~ 2000 g);
5. Reduzir a velocidade do rotor para 60 rpm enquanto perdurar a medição (1-2 minutos), cada tubo sendo amostrado uma vez a cada segundo; e
6. Gerar uma série de tempo de contagem de fóton para cada amostra para exibição e/ou entrada em um algoritmo de computador para avaliação.

Um exemplo de dados a partir de medições de 16 canais, visto na FIG. 40, mostra um LOD comparável àquele do método de tubo único.

Embora esse sensor meça 16 amostras na medida em que são projetadas, grandes números de amostras são possíveis mediante o aumento do número de canais, ainda que o tamanho físico e as estatísticas de amostragem sejam os parâmetros que ditarão, no final, os limites práticos. Similarmente,

números de amostra menores são possíveis mediante a diminuição ou do número de amostras carregadas em um sensor, ou mediante a redução do número de canais no sensor. Um esboço de CAD de um projeto de sensor portátil  
5 de 16 canais é mostrado na FIG. 41.

Uma implementação adicional desse projeto de 16 canais é referida como um sensor TCAN. O biosensor TCAN (Triggered-CANARY) é um biosensor automatizado que combina a distribuição de coleta de aerossol e líquido de células-B  
10 em um formato de disco radial integrado. O disco CANARY TCAN (CD) (FIG. 42) interfaceia uma montagem de distribuição que divide um fluxo de ar em canais separados. A montagem de coleção de aerossol (FIG. 43) usa técnicas de colisão a seco para, então, localizar partículas de fluxo  
15 de ar no fundo dos tubos de plástico transparente. Após a colisão de partículas de aerossol, o CD interfaceia com a montagem de distribuição para acionar válvulas localizadas no disco. O disco é rapidamente girado, o que por sua vez causa a distribuição de líquido de células emissora para  
20 tubos individuais usando força centrífuga (FIG. 44). Um detector óptico é então usado para identificar bioagentes potenciais com base na produção de fótons de células emissoras que interagem com as partículas de aerossol esse processo de coleção de aerossol e distribuição de célula  
25 emissora pode ser repetido várias vezes em um disco. Essa característica permite que ensaios de CANARY múltiplos sejam realizados após vários eventos de trigger sem mudar o CD.

TÉCNICAS DE COLETA DE AEROSSOL

Tecnologias de coleta de aerossol a seco especificamente adaptadas para o sensor de CANARY foram desenvolvidas para obter máxima vantagem da velocidade potencial de CANARY. Ao contrário de muitos outros sistemas de coleção de ar que requerem agentes umidificantes e fluídicos complicados, o sistema de colisão a seco coleta de partículas diretamente do ar em uma superfície seca, por meio disso, eliminando quase todos os consumíveis do processo. Em adição a baixa consumação de material desse sistema de colisão, ele não sofre com baixa temperatura externa de congelamento experimentada por sistemas de coleta com base em líquido.

Esse método de coleta simples separa mais partículas de patógeno denso da corrente de ar mediante a exploração de momento relativamente elevado de partículas para forçá-las colidir em uma superfície seca onde uma fração de partículas colididas são ligadas não especificamente e retidas. O conceito básico e um dos nossos protótipos de coletor são mostrados na FIG. 23.

O impactador de aerossol ideal mostra pouca ou nenhuma coleção de partículas muito pequenas (que pode seguir a corrente de ar desviada), quase 100 % de coleta de partículas grandes (das quais o momento as leva para fora da corrente de ar), e uma transição suave na eficiência de captura para tamanhos de partículas entre esses extremos. Impactadores são tipicamente caracterizados por tamanho de partícula na qual ocorre 50% de eficiência de coleta. A FIG. 160 mostra que para este protótipo de impactador de tubo, 50 % de eficiência de coleta ( $D_{50}$ ) ocorreu em

aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  em uma taxa de fluxo de 5 mL/min. A coleta de números totais maiores de partículas foi realizada facilmente mediante aumento de taxa de amostragem ou tempo de amostragem para aumentar o volume total de ar amostrado.

Sensores de CANARY foram usados para identificar bioagentes coletados usando colisão a seco sem processamento adicional uma vez que esse método localiza bioagentes da superfície do tubo, eliminando a necessidade de pré-rodar a amostra para desempenho máximo. Isso permitiu que o protocolo de ensaio de CANARY para identificação de amostras secas fosse muito mais rápido e simples para realizar (e automatizar) que o protocolo usado para amostras de líquido. A identificação de amostras secas também tem o potencial para prover sensibilidade melhorada no todo para pequenos vírus e outros patógenos que não prontamente sedimentáveis em ensaio de líquido uma vez que todas as partículas coletadas estarão aderidas ao fundo do tubo durante a colisão sem levar em consideração o tamanho de patógenos individuais incorporados na partícula de aerossol.

Prova de conceito para integrar colisão seca com CANARY

Para demonstrar a eficácia da técnica de coleta de colisão a seco para aplicação de sensor de CANARY, esporos de *Bacillus subtilis* individuais foram aerossolizados com um nebulizador de colisão e coletados no protótipo mostrado acima por 30 segundos a 5 litros por minuto. As células B foram adicionadas diretamente ao tudo contendo a amostra,

colocadas no equipamento CANARY portátil, giradas por 5 segundo e o sinal de luz quantificado por PMT. Os resultados são exibidos na FIG. 166 e mostram que a técnica de colisão direta rende uma resposta de célula B que é similar na cinética a das amostras de líquido pré-rodadas sem nenhuma necessidade para preparação de amostra antes da análise.

Com o tempo de resposta total tão curto quanto um minuto nesse experimento de prova de conceito (coleta de 30 segundos seguida por intensidade de fóton de pico de menos que 30 segundos de análise) CANARY demonstrou o potencial para aumentar a sensibilidade de velocidade combinada para identificação de bioaerossol por mais que uma ordem de magnitude comparada a todos os outros sensores de identificação de bioaerossol automatizados. Esse melhoramento dramático de desempenho possibilita sensores de CANARY preencher uma lacuna de tecnologia permanente e longa no desempenho do sensor impedindo a detecção sensível de ~ 3 minutos que é preciso para prevenir e proteger populações da exposição a bioaerossóis de tratamento. Sensores de CANARY proveram a primeira (e ainda a única) demonstração do potencial para detectar-para-prevenir (também conhecida como detectar-para-protetor) a capacidade de biodefesa em um sensor de identificação biológica. Essa única demonstração de potencial motivou o rápido desenvolvimento de aerossóis automatizados para possibilitar que a tecnologia deixe o laboratório e opere em ambientes reais para estabelecer a utilidade no mundo real do CANARY.

DESENVOLVIMENTO DE SENSOR DE BIOAEROSSÓL CANARY  
AUTOMATIZADO

Para demonstrar a capacidade de detectar-para-prevenir  
5 em aplicações de defesa de bioaerossóis, a tecnologia de  
identificação CANARY foi integrada de forma total com a  
arquitetura de coleta de aerossol a seco em dois primeiros  
sensores de geração, BCAN e TCAN. O sensor BCAN foi  
projetado para prover 30 amostragens automatizadas e ciclos  
10 de análise antes de se recarregar com sensibilidade  
suficiente para detectar meios com baixa concentração e foi  
testado amplamente em uma variedade de ambientes para  
estabelecer curvas ROC que caracterizam o desempenho do  
CANARY e taxas falso positivas em uma variedade de  
15 ambientes reais. As boas características de desempenho  
demonstradas pelo sensor BCAN proveram o fundamento que  
motivou o desenvolvimento TCAN em um programa separado para  
demonstrar um sensor de CANARY simplificado adaptado para  
satisfazer menos exigências de demanda antecipada para  
20 monitorar bioaerossol interno.

DESENVOLVIMENTO TESTE DE SENSOR BCAN

A primeira etapa para o desenvolver qualquer sensor de  
CANARY automatizado com base nos resultados de prova de  
conceito foi projetar um modo confiável para combinar a  
25 coleta a seco com um ensaio de CANARY de giro melhorado.  
Além disso, uma vez que sistemas fluídicos não são  
necessários nessa arquitetura, para distribuição de  
reagente de coleta de líquido (já que eles estão em todos  
os outros sensores de identificação de aerossol), o esforço

de projeto foi o armazenamento e distribuição de gotículas de célula sem mecanismos fluídos. Essa aproximação única de combinar coleta de aerossol sem reagente com um biosensor a base de célula em um formato automatizado, possibilita a

5 eliminação completa de um sistema de núcleo que conta com muitos dos custos elevados, de tamanho e complexidade aumentados, e confiabilidade reduzida de outras plataformas de sensores de identificação de aerossol. A solução final implementada para o sensor BCAN utiliza carreadores simples

10 que incorporam características de coleta de aerossóis adequadas, e alíquotas individuais de células B armazenadas em cápsulas COTS, que liberam seus conteúdos automaticamente durante um giro breve após a coleta. Os detalhes chave desse projeto são apresentados na FIG. 167.

15 Cada carreador BCAN controlado por 4 mecanismos paralelos (ou canais) que fornecem as funções de quatro núcleos necessárias para as análises de CANARY: armazenamento de célula, amostragem de aerossol, distribuição de célula e transmissão de sinal para os PMTs.

20 O BCAN de leito de teste foi controlado e processado automaticamente até que 25 desses carreadores entre o recarregamento. As características de sensibilidade e velocidade para o BCAN foram estabelecidas usando aerossóis de esporos de *Bacillus subtilis* gerados por nebulizador de

25 colisão como um simulador para antraz e outros bioaerossóis e demonstrou que esse primeiro sensor pode prover mais de 96 % de probabilidade de identificação para bioaerossóis em concentrações maiores ou iguais a partículas contendo 100 agentes por litro de ar (ACPLA) com um tempo de resposta

total de 3 minutos que inclui a análise e coleta de aerossol automatizado. Além disso, esse sensor foi operado em uma variedade de localizações internas e externas.

5 Mais de 13.000 testes foram completados em nove localizações diferentes rodando em uma ampla faixa de condições de base e os resultados estabeleceram que a frequência dos sinais positivos anômalos (falso positivos) dados por esse sensor em ambientes reais foi similar a frequência dos falso positivos observados em laboratório.

10 Esses resultados juntos demonstraram a utilidade desse primeiro sensor para identificação de bioaerossol sensível, rápida em menos de 3 minutos. Além disso, foi demonstrado que o tempo de coleta necessário para a identificação positiva de um bioaerossol foi proporcional a concentração

15 de bioaerossol presente de modo que tempos de resposta totais de menos de 90 segundos forma possíveis para concentrações suficientemente elevadas de bioaerossol. Nenhuma outra plataforma de sensor com base em anticorpo ou ácido nucléico demonstrou esse velocidade de resposta em um

20 sensor de bioaerossol automatizado.

Um aumento no número de testes pode ser alcançado mediante a colocação de linhagens de células B múltiplas ou linhagens de células B individuais que expressam múltiplos anticorpos em um tubo individual ou canal. Tal sistema que

25 utiliza combinação de anticorpo ou linhagem celular minimiza a complexidade de hardware (e tamanho) e pode detectar  $2^n - 1$  agentes independente (onde  $n$  é o número de canais) para um cenário de ataque de agente único. O limite prático de ensaios de CANARY usando tipos múltiplos de

células por canal é atingido com misturas de três diferentes linhagens de células B. Na medida em que mais de três tipos de células por tubo são usados, a força do sinal em baixas concentrações do alvo cai para abaixo do limiar de detecção enquanto que a probabilidade de interações de células B - alvo corretas diminui. Em adição a expansão do número de agentes que podem ser identificados por um dado número de canais, a introdução de redundância de teste usando essa aproximação foi usado para eliminar falsos positivos não correlacionados (testes onde nem todos os testes simultâneos para um dado agente gera resultado positivo) e reduzir a taxa de falso positivo significativamente. O extenso conjunto de medições e trabalhos em campo demonstrou a capacidade de BCAN para identificar bioaerossóis em concentrações biologicamente relevantes em tempo tão baixo quanto 90 segundos. Esse tempo de resposta é de uma ordem de magnitude mais rápido que qualquer outro sensor de identificação de bioaerossóis integrado, e é a única demonstração de velocidade consistente com as necessidades de operações de detectar-para-protéger para defesa biológica. Porventura, de forma ainda mais importante, as baixas taxas de falso positivo estabelecidas para os testes CANARY em situações de mundo real (entre 0,2 % e 0,3 % para testes únicos, e 0,1 % ou menos para redundância de 2 vezes, ou maior, enquanto mantendo a probabilidade de identificação maior ou igual 96 %) mostra que essa capacidade pode ser implementada praticamente em sistema que demandam baixas taxas de alarme falso e velocidade superior para bioaerossol ID. Enquanto o

BCAN foi designado para ser uma demonstração poderosa de leito de teste, outras arquiteturas de sensores oferecem vantagens potenciais para aplicações customizadas. Motivado pelos recentes sucessos do BCAN, o desenvolvimento do sensor TCAN foi iniciado como um esforço de desenvolvimento de sensor paralelo para estabelecer desempenho de CANARY para proteção de construção usando um projeto de sensor customizado.

#### DESENVOLVIMENTO E TESTE DE SENSOR TCAN

10 O TCAN é um biosensor com base em CANARY desenvolvido com um meio efetivo custo, simples para monitorar em tempo real de bioaerossóis em ambientes internos de construção.

Esse sensor particular foi projetado para combinar coleta de aerossol e distribuição de células B em um formato de disco radial integrado. O disco é projetado para se interfacear um distribuidor que separar fluxo de ar carregado de particulado em quatro canais separados. Técnicas de colisão inercial são então usadas para localizar essas partículas no fundo dos tubos transparentes disponíveis.

20 Após a coleta de partículas de aerossol, as válvulas localizadas dentro do disco são abertas, e o disco é rapidamente girado a 2.000 RPM por 5 segundos. Essa etapa de giro rapidamente põe líquido de células B em contato com as partículas coletadas usando força centrípeta. Um tubo fotomultiplicador (PMT) é, então, usado para identificar bioagentes potenciais com base na produção de fóton de células B que interagem com as partículas de aerossol na medida que o disco roda. Esse processo de coleta de

aerossol e distribuição de células B pode ser repetido várias vezes, permitindo que ensaios de CANARY múltiplos sejam realizados em um único disco.

Esse sensor de CANARY pode gerar identificação de confiança elevada de partículas suspeitas em menos de 3 minutos.

#### DESENVOLVIMENTO E TESTE DE SENSOR PANTHER

Com base nos sucessos e lições das duas primeiras gerações de sensores de CANARY automatizados, foi incorporada a tecnologia CANARY em uma plataforma de sensor de bioaerossol flexível chamada PANTHER (analisador de patógeno para emissões ambientais). As funções de núcleo da coleta de aerossol e de análise de CANARY foram projetadas em um disco simples com 16 canais que formam um núcleo da família de PANTHER de segunda geração de sensores de identificação de aerossol de missão específica. Os sensores de PANTHER finais são planejados para uso de forma individual ou em redes para prover proteção de construção/localização, resposta de emergência, seleção rápida e monitoramento ambiental. A identificação de confiança elevada de bioaerossóis de concentração muito baixa em menos de 2 minutos foi demonstrada usando o sensor o primeiro sensor PANTHER uma unidade portátil referida como o CUB, que é 37 lb (16,7 kg), ~ 1 ft<sup>3</sup> (0,03 m<sup>3</sup>) ser feito por menos que \$20K. O projeto testado é simples e confiável: não possui nenhum consumível líquido, fluídico, partes de movimento mínimo que carrega como um CD player e coleta e analisa a amostra automaticamente. O sensor CUB foi resultado de um projeto que inicialmente focando no

desenvolvimento de um sensor com base em CANARY que pode realizar todas as compilações automatizadas e funções de análise do sensor de bioaerossol atual pelo exército dos EUA - sistema de detecção biológica de ponto de junção, ou 5 JBPDS. O disco de PANTHER foi projetado para ser o núcleo desse sensor e possibilitar que 16 testes simultâneos fossem realizados em um aerossol único. O desenvolvimento CUB seguiu aquele esforço de projeto inicial e demonstrou a extremidade oposta da complexidade do sensor de espectro de 10 capacidade: um sensor portátil, barato, e pequeno que pode processar automaticamente um disco de PANTHER único. O sensor CUB resultante foi designado, fabricado e testado. R

Os resultados preliminares demonstraram que o CUB oferece sensibilidade e velocidade melhoradas, detecção de 15 esporo em aerossóis em concentrações abaixo de 10 ACPLA e tempos de resposta menores que 2 minutos incluindo identificação e coleta em um sensor muito menor e menos caro. Teste de ambiente adicional nos mesmos ambientes usados para caracterizar o sensor de bioaerossol de BCAN 20 demonstraram que o PANTHER CUB também possui uma taxa de falso positivo muito baixa em ambientes reais

#### FUNÇÃO E PROJETO DE DISCO DE PANTHER CUB

O disco usado em sensores PANTHER desenvolve duas 25 funções primárias: 1) prover geometrias específicas que possibilitam coletar partículas de aerossol fora do ar sendo esboçadas através do disco e deposita-las em uma localização focada para análise direta usando CANARY; e 2) armazenar as células B de CANARY em reservatórios vedados 1

que permitem que o reagente seja dispensado nas partículas de aerossol coletado sem controle manual. Duas partes, um corpo de carreador e uma tampa foram projetadas para serem de injeção amoldável e acessível para soldagem ultra-sônica para formar o disco completo que tem 120 mm de diâmetro e 6 mm de altura com espessura de parede uniforme de aproximadamente 1 mm (FIG. 173). O polímero preferido para o disco é o homopolímero de polipropileno por ter demonstrado compatibilidade superior com células B para armazenamento de longo período, mas qualquer outro polímero com transparência suficiente (para transmissão de sinal a partir de células B para o elemento sensível a luz) e compatibilidade com células B também seria adequado.

O corpo de carreador possui um fundo contínuo com paredes verticais orientadas para formar uma pluralidade de conjuntos de características relacionadas no disco soldado para aceleração e coleta de aerossol e para armazenamento e distribuição de reagente líquido que são arranjos radialmente ao longo do eixo central. Essas características podem ser idênticas ou podem ser adaptadas individualmente para possibilitar que uma faixa de funções de ensaio e coletor seja provida por um disco único. Um conjunto interno de paredes, FIG. 173A - esboço 1, conduz e acelera o fluxo de ar na direção as fendas no perímetro externo do disco com comprimentos e espaçamentos a partir da parede externa que pode ser adaptada para prover coleta eficiente partículas de aerossol em uma variedade de taxas de fluxo usando princípio bem estabelecidos na literatura (dar referência). Um conjunto externo de paredes, FIG. 173 A -

esboço 2, formam um perímetro contínuo em torno da extremidade do disco e provê locais de coleta de partícula individual com geometrias definidas, que ajudam a coletar as partículas aceleradas, pelo conjunto interno de paredes em uma pluralidade de locais com áreas localizadas demonstrando densidade de partícula aumentada.

Um outro conjunto de paredes posicionado entre A e B, FIG. 173 A - esboço 3, cria uma pluralidade de compartimentos de discos soldados que podem conter reagentes líquidos e outros materiais que provém para sua liberação e distribuição nas partículas coletadas durante um giro subsequente ou giros. A parede pode ser projetada de modo que um giro único distribua células de CANARY armazenada a partir de todos os compartimentos ou de modo que giros múltiplos possam distribuir o conteúdo de compartimentos individuais ou subconjuntos de compartimentos na demanda.

A tampa possui a forma de um disco espesso de 1 mm com dois conjuntos chave de mecanismos. O primeiro conjunto de mecanismos compreende uma variedade de perfurações para permitir a introdução de reagentes líquidos (FIG. 173 B - esboço 3) e amostras de aerossol (FIG. 173 B - esboço 1, entrada, e FIG. 173 B - esboço 2, saídas) no disco montado, e provê um mecanismo de indexação (J FIG. 173 B - esboço 4) que pode ser detectado por um sensor óptico para detectar a orientação do disco durante a leitura. O segundo conjunto de mecanismos compreende estruturas elevadas em ambos os lados, o que possibilita que a tampa forneça septos que reduzem a transição de luz entre os canais adjacentes e o

disco (FIG. 173B - esboço 5), (quando o polímero usado para formar o disco contém um pigmento adequado para torná-lo opaco), fornece mecanismos para intensificar a solda ultrassônica das metades do disco, e 3) reduzir a área de contato requerida para formar uma vedação de ar com o distribuidor que libera aerossol para o disco e remove ar empobrecido após a coleta de partículas no disco (anéis circulares apenas dentro e fora das saídas de ar).

A FIG. 174 ilustra como os mecanismos A e B no disco soldado funcionam juntos para conduzir fluxos de aerossol em coleta de partículas. Aplicando um vácuo parcial usando uma ou mais bombas ou turbinas para o arranjo de aberturas triangulares na tampa do disco entre as duas arestas circulares arrasta o aerossol para ser amostrado no disco através da grande abertura central o ar é distribuído em uma pluralidade de canais flui radialmente para fora na medida que o canal se afila para baixo para acelerar o aerossol enquanto este se aproxima do perímetro do disco. O fluxo de ar é, então, forçado a fazer uma curva acentuada no perímetro externo do disco, antes de ser arrastado através das aberturas triangulares. O momento das partículas de aerossol carregadas na amostra de ar impede que as partículas voltem com o ar, e elas ao invés, colidem com a superfície interna do disco em pontos focados que podem ser adaptados mediante ajuste da geometria da parede externa do disco. Uma fração significativa de partículas na faixa de tamanho de interesse (tipicamente entre 1 e 25  $\mu\text{m}$ ) adere a superfície quando elas colidem e são retidas para subsequente análise de CANARY. A distribuição da coleta no

disco foi caracterizada usando partículas de poliestireno esféricas fluorescentes de 1  $\mu\text{m}$ . Essas partículas foram aerossolizadas, então o ar foi arrastado através do disco em uma taxa de 30 L/min/canal e a distribuição resultante de partículas foi visualizada sobre iluminação ultravioleta. Isso demonstrou que a distribuição de partículas coletadas pode ser adaptada de modo que as partículas coletadas em duas linhas densas com posições determinadas pela localização de interseções de segmento de parede na superfície de coleta. Quando as interseções são posicionadas para estarem no raio máximo do disco isso resulta em co-localização confiável das partículas coletadas, e as células de CANARY liberadas para estimulação e detecção de sinal óptico. Ao ajustar a taxa de fluxo o bico pode possibilitar que a faixa de tamanho de partículas coletadas desse projeto de disco seja ajustada como necessário. A FIG. 175 ilustra a relação entre a taxa de fluxo e o tamanho de partículas que são efetivamente transportadas através do disco e conduzidas para colidir na superfície de coleta. Em altas taxas de fluxo partículas maiores ou iguais a 1 mm de diâmetro possuem momento suficiente para contatar a superfície de coleta, entretanto o limite de tamanho superior prático para essa taxa de fluxo é 8  $\mu\text{m}$  porque partículas maiores ou iguais a 8  $\mu\text{m}$  possuem muito mais momento é para fazer a volta inicial de 90° que ocorre na medida em que o aerossol volta da entrada central nos canais radiais de ar que estão no plano do disco. A redução de fluxo de ar aumenta gradualmente o diâmetro de corte das partículas que possuem momento

suficiente para colidir com a superfície, mas também possibilita que as partículas façam a volta inicial no disco e expande a faixa de tamanho total de partículas que podem ser coletadas no local de análise. Por exemplo, 5 abaixar a taxa de fluxo para 4 L/min ajusta a faixa de tamanho de partículas coletadas para um valor entre 2,5 µm e 25 µm permitindo que partículas de aerossol muito maiores sejam coletadas e analisadas.

A FIG 176 ilustra como o mecanismo do disco soldado 10 que funciona junto para prover armazenamento e distribuição de reagentes líquidos. As paredes nas zonas de armazenamento de reagentes são orientadas para formar uma bolsa que possui uma abertura voltada para o raio externo do disco, de modo que orifícios posicionados 15 apropriadamente na tampa forneçam portas de acesso e de ventilação nessa bolsa para carregar: 1) um plugue viscoso para bloquear a abertura do resto do disco, seguido por 2) adição de reagente líquido (por exemplo células B) através da porta de carregamento enquanto o ar escapa através do 20 orifício de ventilação. A adição de uma parede curta que se projeta na zona de armazenamento de reagente que separa a porta de carregamento da porta de ventilação assegura o preenchimento completo da bolsa durante o carregamento. Uma vez que o carregamento do reagente líquido é completado, os 25 orifícios de acesso são cobertos usando uma fita adesiva para vedar o líquido em uma bolsa que permanece resistente a líquido e ar até que a distribuição seja desejada. Para liberar o reagente líquido o disco é girado em uma RPM suficiente (tipicamente 4.000 RPM) de modo que as forças de

aceleração radiais são suficientes para deslocar o plugue viscoso de sua posição por meio disso abrindo a bolsa em direção ao exterior do disco e possibilitando que o líquido flua para o raio externo do disco e cobre as partículas de aerossol coletadas. Para líquidos contendo células B o giro de 5 segundos que é usado para dispensar o reagente líquido é também suficiente para sedimentar às células B suspendidas na parede externa do disco e localizá-las onde as partículas de aerossol foram coletadas.

Seguindo a distribuição de células B e quaisquer outros reagentes líquidos, o giro é diminuído (tipicamente entre 30 e 120 RPM) para possibilitar que um elemento sensível a fóton único (por exemplo, um tubo fotomultiplicador (PMT), um canal fotomultiplicador (CPM) ou outro dispositivo de contagem de fóton) para registrar seqüencialmente o nível de emissão de luz de cada canal na medida em que passam na frente do sensor de fóton. O disco continua a rodar enquanto a produção de luz é monitorada por até 2 minutos, então os dados são processados e armazenados pelo sensor usado para processar o disco ou por um computador.

#### DESCRIÇÃO DE SENSOR PANTHER

A vista total de um sensor compacto que foi construído para processar automaticamente os discos de CANARY é mostrado na FIG. 177. O corpo do sensor 12" H X 12" W X 14" D, pesa aproximadamente 37 lbs (16,8 kg), e possui todos os componentes e controle necessários para compilar e analisar automaticamente amostras de aerossol usando um disco de CANARY único carregado manualmente. O carregamento do disco

é realizado mediante abertura de uma gaveta (FIG. 177 -  
esboço 1), colocação de disco em uma plataforma, e  
fechamento da gaveta. Quando o sensor recebe um sinal para  
compilar e analisar uma amostra, o sensor começa a puxar ar  
5 por meio da porta de entrada (FIG. 177 - esboço 2),  
conduzindo-o através do disco e, então, exaurindo as  
partículas de ar empobrecidas através da porta de saída  
(FIG 177 - esboço 3). Seguindo a coleta de aerossol por um  
tempo determinado ou por um parâmetro pré-ajustado ou por  
10 um sinal recebido de um controlador externo, o sensor vira  
o disco em uma velocidade suficiente para liberar os  
reagentes de CANARY ( tipicamente 4.000 RPM) e se inicia a  
fase de análise durante a análise o giro é diminuído para  
possibilitar que a emissão de fóton seja medida por cada  
15 canal individual no disco na medida que este gira na frente  
de um módulo de contagem único.

Os seguintes componentes de núcleo (ilustrado no FIG.  
178) foram montados no primeiro sensor e são suficientes  
para desempenhar todas as funções de coleta e análise, e  
20 possibilitou o desempenho descrito abaixo. O disco de  
CANARY (FIG 178 - esboço 4) foi colocado na montagem de  
motor (brushless DC motor Faulhaber part# 3564K012BK1155,  
FIG. 178 - esboço 5) e porta foi, então, fechada para  
carregar o disco na caixa resistente a luz de costume (FIG  
25 178 - esboço 7). Duas turbinas Ametek (part# 150193, FIG  
178 - esboço 1) foram conectadas a um distribuidor de  
costume (FIG. 178 - esboço 6) que forneceu a interface com  
o disco CANARY e conduziu os fluxos de entrada e de saída  
na medida em que eles entraram e saíram do disco. Quando as

turbinas foram ligadas o disco foi automaticamente levantado em um local abaixo do distribuidor e o vácuo das turbinas mantiveram-no no local e forneceram força de vedação para assegurar que o próprio aerossol flui através do disco. Depois que as turbinas foram desligadas o disco caiu automaticamente na montagem de motor e girou o disco a 4.000 RPM por 5 segundos para liberar as células, então diminuiu o giro para 60 RPM. Aquela velocidade foi mantida por 2 minutos enquanto o módulo fotomultiplicador de canal (Perkin Helmer part# MCP1984, FIG 178 - esboço 2) mediu a produção de luz de cada canal individual. Esse processo inteiro foi controlado por um computador PC104 onboard da Diamond Systems part# ATH660-128 com uma placa de interface de costume, FIG 178 - esboço 3).

#### 15 DEMONSTRAÇÕES DE DESEMPENHO DE SENSOR PANTHER

Para estabelecer a sensibilidade do sensor, aerossóis de testes foram produzidos mediante a nebulização de colisão de diluições de uma solução de estoque concentrada de esporos de *Bacillus subtilis*, amostrados por um minuto e analisados usando células específicas para os esporos CUB. Níveis aproximados de ACPLA produzido por cada diluição são mostrados na legenda da FIG. 179 a diluição de 1:8.000 gerou um número de partículas por litro que foi indistinguível do fundo de câmara produzido quando água DI foi adicionada ao nebulizador, mais com base na tendência geral a concentração deve estar na ordem de 5 esporos por litro de ar. Mesmo nesta concentração extremamente baixa uma amostra de 1 minuto produziu consistentemente um sinal

facilmente detectável com uma intensidade de pico de mais que 3 X maior que o controle negativo.

Os dados de identificação de simulador a partir de estudos de câmara foram, então, combinados com medições de base feitas em ambiente interno típico, por um período de 5 uma semana (> 1.000 testes) usando linhagens de células específicas para *YERSINIA PESTIS* e *Bacillus Anthracis*. A análise dos dados resultantes demonstrou que o sensor PANTHER CUB forneceu mais que 95% de probabilidade de 10 detecção para concentrações maior ou igual a 50 ACPLA com uma taxa de alarme falso correspondente de ~ 0,1%. Esse desempenho forneceu uma intensificação significativa da capacidade comparada ao desempenho dos sensores BCAN de primeira geração e TCAN e pode ser mais otimizada com o 15 desenvolvimento de algoritmo e refinamentos de hardware adicionais.

#### EXEMPLO DE DETECÇÃO DE TOXINA

A detecção de proteínas solúveis pode ser alcançada usando uma variedade de métodos. Por exemplo, em um método, 20 dois anticorpos podem ser expressos na mesma célula emissora, em que os dois anticorpos estão cada um contra um epítipo diferente na mesma molécula. Os anticorpos são, então, reticulados por antígeno monomérico (FIG. 48). Deve ser notado que a classificação de anticorpos no caminho 25 secretório é idealizada no esquema da FIG. 48. Em um exemplo, os anticorpos podem ser heterofuncionais, isto é, um anticorpo pode ter dois diferentes locais de ligação de antígeno funcional. Em outro um exemplo, cada anticorpo possui apenas um local de ligação de antígeno funcional.

Esse método depende de dois fatores: (1) anticorpos funcionais múltiplos são expressos pelo mesmo emissor e (2) dois epítomos ligados são suficientes para estimular células emissoras (entretanto mais que um desses pares pode ser requerido para estimular uma dada célula).

Em um experimento, anticorpos funcionais, múltiplos foram expressos na mesma linhagem de célula emissora (FIG. 49). Uma linhagem de células única que expressa anticorpos contra *Bacillus anthracis* e *Yersinia pestis* foi gerada. Essa linhagem de célula clonal reage contra ambos os antígenos com sensibilidade boa. Deve ser entendido que dois anticorpos entre contra dois epítomos no mesmo monômero solúvel também podem ser funcionalmente expressos. Além disso, dois epítomos ligados são suficientes para estimular células emissoras.

Um segundo método para detectar antígenos monoméricos, solúveis é reticular o antígeno solúvel para fazê-lo parecer multivalente para a célula emissora (FIG. 50). Essa reticulação pode ser feita mediante a fixação da proteína à microesferas, ou por meio de identificações, no caso de proteínas recombinantes, ou por meio de anticorpos, como foi demonstrado para o fragmento de toxina botulínica Hc. Existem variedades de outros métodos possíveis para reticular o antígeno eficientemente, como será entendido pelos técnicos no assunto, incluindo precipitação do antígeno com ácido tricloroacético (TCA), calor, ou etanol, e fixação do antígeno a uma fase sólida por meio de ligantes, anticorpos ou grupos funcionais químicos. Esse monômero reticulado pode, então, ser detectado usando

células emissoras que expressam anticorpo que reconhecem um epítopo ainda disponível no antígeno reticulado.

Esse segundo método demonstrou na prática, usando a cadeia pesada de toxina botulínica tipo A (BoNT/A Hc) como a proteína alvo monomérica, solúvel (FIG. 51) e anticorpos descritos em Pless e colaboradores, *Infection and Immunity* (2001) 570-574. Um anticorpo monoclonal (6E10-10) contra um epítopo foi reticulado a microesferas revestidas com proteína G. Essas microesferas foram incubadas com BoNT/A Hc por 3 horas a 4°C, lavadas, e usadas para estimular células emissoras que expressam um segundo anticorpo (6B2-2) que reconhece um epítopo de BoNT/A Hc diferente. As microesferas recobertas com BoNT/A Hc estimularam efetivamente as células emissoras, com um LOD de aproximadamente 6 ng. As células que expressam o mesmo anticorpo como aquelas usadas para ligar o BoNT/A a microesferas não foram estimuladas, indicando que a reação de emissores não foi causada por agregação da proteína alvo.

#### 20 EXEMPLO DE DETECÇÃO QUÍMICA

A detecção química é de importância no ambiente clínico e militar. É possível que alguns produtos químicos possam ter dois epítomos nos quais os anticorpos podem se ligar independentemente. Em tais casos, os métodos para detecção química seriam idênticos àqueles para detecção de toxinas delineadas acima. Em muitos casos, entretanto, não existirão dois epítomos independentes no produto químico de interesse. Em tais casos, será necessário modificar o produto químico tal que este seja capaz de estimular a

célula emissora. Quatro dessas modificações são delineadas abaixo.

1. Imobilização do produto químico de interesse em um suporte sólido. Gerar células emissoras que expressam anticorpos que reconhecem a porção do produto químico que permanece disponível. Quando a densidade do produto químico imobilizado no suporte sólido é alta o suficiente, anticorpos na superfície de célula emissora serão imobilizados próximos o suficiente um do outro para estimular a célula. Isso é análogo ao esquema para detecção de toxina mostrado na FIG. 50.

2. Inicialmente, gerar peptídeo(s) que se ligam especificamente ao produto químico. Em seguida, gerar anticorpos que se ligam especificamente ao complexo peptídeo-produto químico. Se o complexo peptídeo-produto químico é composto de dois ou mais epítomos, o complexo pode ser detectado por qualquer uma das técnicas de anticorpo-duplo delineadas na seção de detecção de toxina. Se o complexo é apenas composto por um epítomo específico, então um epítomo adicional, tal como digoxigenina, pode ser adicionado sinteticamente ao peptídeo (FIG. 52). O complexo então teria dois anticorpos que se ligam em locais: (1) o epítomo formado pelo complexo peptídeo-produto químico e (2) o epítomo de digoxigenina. Apenas na presença de produto químico ambos os epítomos estão presentes. Esses dois epítomos podem ser detectados por qualquer uma das técnicas de anticorpo-duplo delineada na seção de detecção de toxina.

3. Gerar dois peptídeos que se ligam especificamente ao produto químico (ou um ao outro na presença de produto químico). Cada um desses peptídeos pode ser marcado sinteticamente, tal que apenas em presença do produto químico dois epítomos seriam ligados uma ao outro e, portanto, detectáveis por célula emissora (FIG. 53). Alternativamente, um ou mais anticorpos podem ser feitos contra o complexo peptídeo-produto químico, e a presença de produto químico detectada como acima usando uma combinação de anticorpos contra o complexo, ou um anticorpo contra o complexo e um anticorpo contra um peptídeo marcado.

4. Como acima, gerar peptídeo(s) que se liga(m) especificamente ao produto químico, e gerar anticorpos que se especificamente ao complexo peptídeo-produto químico. Dimerizar o peptídeo ligado ao produto químico, tal que se o dímero se liga a dois produtos químicos, este conterá dois locais de ligação de anticorpos. Esse complexo pode ser detectado por células emissoras que expressam um anticorpo contra o complexo peptídeo-produto químico.

Peptídeos que se ligam a molécula pequenas foram isolados a partir de bibliotecas combinatórias. Essas moléculas incluem porfirina (Nakamura e colaboradores, Biosensors and Bioelectronics 2001, 16: 1095-1100) triptofano (Sugimoto e colaboradores, 1999, 677-678) e cádmio (Mejare e colaboradores, 1998, Protein Engineering 11(6): 489-494). Entretanto o uso de proteínas no lugar de peptídeos pode render ligantes de mais elevada afinidade. As bibliotecas foram construídas nas quais os locais de ligação foram definidos de forma combinatória, e estes

podem ser usados para isolar aqueles que se ligam a moléculas pequenas. Tal biblioteca, que usa lipocalina como a proteína de partida, foi usada para isolar ligantes para variantes de digoxigenina (Schlehuber and Skerra, 2002, 5 Biophysical Chemistry 96: 213:228). Essa aproximação pode ser usada como partida com qualquer número de outras proteínas, mas particularmente aquelas que se espera já ter alguma atividade de ligação com o alvo químico. (por exemplo, acetilcolinesterase, no caso de VX e Sarin).

#### 10 EXEMPLOS ADICIONAIS 1

##### Detecção de ácido nucléico

A detecção de RNA é vantajosa para a detecção de DNA em vários aspectos. Primeiramente, existem mais cópias de um dado RNA por célula (procariótica ou eucariótica) que 15 cópias de um genoma, então o sinal por célula é essencialmente amplificado. Segundo, a presença de RNA é freqüentemente usada como teste de viabilidade. Terceiro, a detecção de RNA não requer desnaturação de duas cadeias complementares, como no caso do dsDNA. Experimentos foram 20 realizados de uma maneira similar para a detecção de ssDNA, exceto que um inibidor RNase foi adicionado (RNasin Plus, Promega Corporation) (FIG. 55). Oligos marcados com Digoxigenina foram adicionados a diferentes concentrações de RNA, incubados a 47°C por 2 minutos. Células de CANARY 25 que expressam anticorpos contra digoxigenina foram adicionadas, o tubo foi girado por 5 segundos, e a produção de luz foi monitorada.

##### Protocolos alternados

CANARY também pode detectar ácidos nucleicos por marcação de forma direta do alvo. Por exemplo, mediante a realização de PCR na presença de nucleotídeo marcado com digoxigenina, desse modo, gerando um produto PCR com múltiplos antígenos fixados ao longo de seu comprimento.

Do mesmo modo, amplificação em círculo rolante pode ser usada para incorporar marcação no ácido nucleico alvo que pode, por sua vez, ser detectado por CANARY. Reação de cadeia de ligase e seus derivados essencialmente dimerizam oligos, e CANARY pode ser usado para monitorar aquela dimerização se ambos os oligos estão marcados com um antígeno cada.

#### Detecção de toxina

CANARY na sua forma básica é incapaz de detectar antígenos monoméricos (FIG. 56), porque os antígenos são incapazes de reticular anticorpos monoclonais: como descrito aqui, o ensaio precisa ser modificado. Duas estratégias gerais estão sendo usadas para detectar simuladores de toxina usando CANARY: (1) fazer o antígeno de toxina parecer polivalente para a célula de CANARY ou (2) fazer o anticorpo expresso pela célula de CANARY policlonal. Por exemplo, o antígeno de proteína pode parecer polivalente para a célula de CANARY mediante a absorção do antígeno a microesferas, células, ou reticular o antígeno com anticorpo solúvel.

Experimentos iniciais foram realizados usando um simulador de toxina, neurotoxina botulínica tipo A, de cadeia pesada (Bont/A Hc). A modificação do ensaio que, até agora, gerou sensibilidade e velocidade muito melhor para a

detecção de simulador de toxina por CANARY é capturar o simulador em microesferas magnéticas revestidas com anticorpos, e detectar a microesfera recoberta com simulador usando células de CANARY (FIG. 57). Três anticorpos monoclonais que reconhecem epítopos não sobrepostos no simulador de toxina BoNT/A Hc; 6E10-10, 6B2-2, e 6C2-4 (doado por Dr. Bavari e Dr. Ludwig, USAMRIID) foram usados. O anticorpo solúvel 6E10-10 é conjugado a microesferas magnéticas marcadas com proteína-G, enquanto o anticorpo 6B2-2 é expresso em células de CANARY. As microesferas revestidas com anticorpo 6E10-10 são incubadas em solução dopada com BoNT/A Hc por 2 minutos, produzindo microesferas recobertas com simulador de toxina. As células de CANARY são adicionadas, e a mistura é girada por 5 segundos para peletizar as microesferas e células. Essas microesferas apresentam o BoNT/A Hc imobilizado para a célula CANARY, reticulam os anticorpos e estimulam a emissão de luz. Essa técnica pode detectar 800 pg de BoNT/A Hc (80 ng/mL) em menos que 5 minutos (FIG. 58).

Deve ser observado que a sensibilidade do ensaio depende da qualidade de BoNT/A Hc. As características de variabilidade lote-a-lote e armazenamento de BoNT/A Hc comercial afeta o limite de detecção aparente (LOD). É importante no estabelecimento do ensaio demonstrar que CANARY é capaz de detectar proteínas solúveis verdadeiramente. BoNT/A Hc não congelada, fresca gera uma resposta mais alta (FIG. 59) que BoNT Hc que foi congelado (o método sugerido para armazenamento). A centrifugação de BoNT Hc congelado-descongelado adicionalmente diminuiu a

reatividade, indicando que agregados se forma durante o processo de congelar-descongelar. A BoNT/A Hc usada nesses ensaios que foram armazenadas congeladas, é tipicamente centrifugada sob descongelamento para remover os agregados. 5 Embora isso subestime a sensibilidade do ensaio, a variação interensaio é diminuída.

O formato ensaio-microesfera é efetivo para a seleção de antígenos solúveis nos produtos de sangue (FIG. 60) usando o procedimento de preparação de sangue total 10 descrito aqui. O sangue total foi dopado com BoNT/A de cadeia pesada , e o sangue foi rapidamente centrifugado através de um polímero para facilitar a separação de células do material solúvel. As microesferas revestidas com anticorpos foram adicionadas ao sobrenadante resultante, e 15 ensaiadas usando células CANARY 6B2-2. A sensibilidade do ensaio é similar a de ensaios realizados em meio de controle, indicando que a maior parte dos interferentes foi removida. Ao dopar plasma com uma concentração idêntica de BoNT/A Hc após separação a partir de células do sangue 20 gera um sinal mais baixo com relação as amostras nas quais o sangue foi dopado diretamente. Essa diferença é provavelmente um artefato da preparação de amostra de sangue, não da presença de um inibidor de CANARY adicional no plasma.

25 O antígeno de BoNT/A Hc dopado na urina também pode ser detectado, entretanto a amplitude de sinal é um pouco reduzida (FIG. 61). Nesse experimento nenhum pré-tratamento foi realizado. As microesferas revestidas com 6B10-10 foram adicionadas diretamente a amostras de urina, as

microesferas foram lavadas em CO2I, e células de CANARY 6B2-2 foram adicionadas. Duas das três amostras de urina dopadas (linhas azuis) mostraram respostas significantes, enquanto que terceira amostra não mostrou. Não está claro a partir desse conjunto de dados limitados porque a terceira amostra de urina foi negativa, ou porque as amplitudes de sinal das amostras na urina são mais baixas que as dos controles positivos (linhas douradas).

O ensaio é também efetivo na detecção de antígeno solúvel dopado em swabs (chumaços) nasais. Para preparar amostras para esse ensaio, swabs são coletados, a haste do swab é preparada e a extremidade do swab é colocada em um cesto de filtro de 5 microns ajustado em um tubo eppendorf (FIG. 62). O controle ou meio de CO2I dopado com BoNT/A Hc é adicionado, e a montagem foi tampada e centrifugada. O eluato filtrado esvaziado de particulados grandes; é coletado no eppendorf e ensaiado usando o procedimento normal de microesfera. Os resultados do ensaio para os swabs reais e de controle dopados com BoNT/Hc são muito similares, indicando que nenhum dos inibidores estão presentes nos swabs nasais (FIG. 63). A falta de uma resposta de CANARY para swabs nasais sem antígenos dopados mostra que não existem estimuladores não específicos presentes na amostra swab nasal.

Muitas soluções, tais como suco de laranja ou PBS/Tx-100, estimulam células de CANARY não especificamente, então é necessário trocar a solução original contendo o simulador de toxina para o meio de ensaio. Em adição a reticulação do alvo, o uso de microesferas magnéticas provê um método

simples de troca de solução contendo o simulador para meio de ensaio compatível com célula. No levantamento de matrizes alimentícias, suco de laranja sobressai na medida que possui um potencial problema de pH (pH = 3,5), e água na medida em que possui um potencial problema de sal (nenhum). Qualquer dessas características poderiam também afetar a habilidade de microesferas revestidas com anticorpos se ligar ao simulador de toxina. Para esses experimentos, um sétimo (1/7) de volume (1,4 microlitros) de uma solução contendo 560 mM de NaCl, hepes 1,4 M com pH 7,9 foi adicionado a todas as matrizes dopadas com BoNT/Hc e microesferas revestidas com anticorpos. Isso leva à matriz de água uma concentração final de sal de 80 mM, o pH do suco de laranja para aproximadamente 6,5 e, simultaneamente, introduz as microesferas conjugadas com anticorpos para iniciar a etapa de ligação.

No final de uma etapa de ligação de 12 minutos, 190  $\mu$ L de meio de amostra é adicionado, o tubo é colocado no ímã por 30 segundos, e o sobrenadante é descartado. As microesferas são ressuspensas em 50  $\mu$ L de meio de ensaio, 20  $\mu$ L de células são adicionadas, o tubo é girado por 5 segundos para sedimentar as microesferas e as células de CANARY, e a produção de luz é monitorada em um luminômetro (FIG. 64). Nesse gráfico, os valores representam a produção de luz de pico normalizada para valores de base. (células de CANARY em meio de ensaio com nenhum antígeno, então a barra vermelha no extremo direito é ajustada para um. Todas as outras barras são respostas máximas com relação a esse controle. As respostas de CANARY para BoNT/A Hc diluído em

suco de laranja ou PBS/Triton são muito similares a do BoNT/Hc diluído em meio de ensaio (controle positivo), com um LOD para todas essas três matrizes de 80 ng/mL. O leite inibe as respostas de CANARY para mais de 5 vezes. Um método de preparação de uma amostra de CANARY generalizado pode ser aplicado a todas as matrizes de líquido.

É obviamente crítico demonstrar que o ensaio funciona não apenas com toxinas simuladoras, mas também com toxina BoNT/A ativa. A BoNT/A comercial foi adquirida e ensaiada usando microesferas de 6E10-10 e células de CANARY de 6B2-2 (FIG. 65) O limite de detecção do ensaio para BoNT/A foi aproximadamente 3,2 ng/mL ou 32 pg de toxina. Não está claro se esse melhoramento na sensibilidade do ensaio é devido a estabilidade de BoNT/A comparada com BoNT/A Hc, ou se existe uma diferença antigênica entre as 2 preparações. Tipos similares de resultados de detecção de BoNT/A foram vistos usando um conjunto alternado de anticorpos contra BoNT/A de Dr. James Marks da UCSF. A melhor combinação desses anticorpos até agora é a de anticorpos S25 ligados a microesferas e células de CANARY que expressam anticorpo Raz (FIG. 66). A razão para a baixa sensibilidade usando esses diferentes pares de anticorpos é, no momento, obscuro.

CANARY também pode detectar BoNT/A dopada no sangue total (FIG. 67). O sangue total foi dopado com várias concentrações de BoNT/A, e o plasma preparado como previamente descrito. Microesferas revestidas com anticorpos 6E10-10 foram adicionadas ao plasma e incubadas por 2 minutos. As microesferas foram lavadas uma vez em CO2I

e ensaiadas usando células de CANARY que expressam o anticorpo 6B2-2. O limite de detecção em gotículas de soro foi de aproximadamente 5 vezes comparado com o meio de controle, para aproximadamente 16 ng/mL (160 pg).

5 Químicas alternadas de ligação de microesfera

Microesferas revestidas com anticorpos também foram feitas mediante a biotinição de anticorpos solúveis e fixação destes as microesferas revestidas com estreptavidina. Anticorpo solúvel foi reticulado a biotina  
10 (Pierce Biotechnology Inc) de acordo com as instruções do fabricante. Esse anticorpo biotinilado foi ligado a microesferas magnéticas revestidas com estreptavidina (DynaL, Dynabeads M-280). Experimentos iniciais indicam que o anticorpo conjugado a sulfo-NHS-LC-LC-biotina gera um  
15 sinal levemente melhor que o anticorpo conjugado a sulfo-NHS-LC-biotina ou sulfo-NHS-biotina (FIG. 68). Microesferas de 6E10-10 produzidas desse modo são capazes de detectar BoNT/A solúvel com sensibilidade similar a das microesferas de proteína G (FIG. 69). Anticorpos múltiplos podem ser  
20 fixados as mesmas microesferas usando essa técnica, entretanto datar os efeitos de ligação de anticorpos múltiplos para as mesmas esferas foi marginal (FIG. 70).

A combinação de incubações mais longas com muito poucas microesferas não melhora a sensibilidade do ensaio  
25 (FIG. 71). Microesferas foram diluídas a partir de sua concentração normal (aproximadamente 300.000 por ensaio) em séries de 10 vezes a partir de 1X a 0,0001X. BoNT/A a 0,32 ng/mL foi adicionada, e incubada durante a noite. Sinais pobres foram vistos para amostras contendo a quantidade

normal (1X) de microesferas, mas amostras com 0,1X e 0,01X de microesferas gerou sinais fortes. Melhoramentos similares na sensibilidade a BoNT/A são vistos usando microesferas revestidas com proteína G.

5           Formatos adicionais para detecção de toxina

Formatos adicionais para Detecção por CANARY de toxinas foram previstos e experimentos práticos foram realizados (ver FIG. 72 do sumário). Muitas dessas variações são, tematicamente, similares a captura de  
10 microesfera em que o antígeno reticulado é apresentado a uma célula de CANARY que expressa um anticorpo monoclonal. Em uma segunda aproximação, por exemplo, as microesferas revestidas com anticorpos são substituídas por células de CANARY, que estão essencialmente vivas, microesferas  
15 revestidas com anticorpos. Duas linhagens de célula de CANARY que expressam anticorpos contra epítomos diferentes na mesma toxina são incubadas em solução que contém a dita toxina. Uma ou ambas as células pode possuir uma molécula emissora. Em alguns exemplos, ambas as células CANARY  
20 compreendem uma molécula emissora, em que as moléculas emissoras são diferentes nas células de CANARY diferentes. Em outros exemplos, ambas as células de CANARY compreendem o mesmo tipo de molécula emissora. No ensaio de ambas as células tornam-se recobertas com toxina, mas a célula não é  
25 estimulada porque a toxina é monomérica. As células são centrifugadas para o fundo do tubo, onde as duas células de CANARY diferentes apresentam o antígeno um ao outro. Essa aproximação é mais efetiva que (LOD = 50 ng ou concentração de 1 µg/mL), mas menos sensíveis que a apresentação de

toxinas nas microesferas. Isso pode ser porque a fixação de uma das células antes do recobrimento com toxina pode restringir mais o movimento dos anticorpos na membrana e, portanto, estimular mais a célula de CANARY oposta.

5           Uma aproximação alternativa é fazer uma célula de CANARY policlonal (aproximação 4). Dois diferentes anticorpos são expressos em uma linhagem de célula de CANARY única. Devido a esses anticorpos se ligarem a epítomos não sobrepostos diferentes na mesma molécula de  
10           toxina, a célula de CANARY pode ser estimulada diretamente ao antígeno solúvel. Estudos de multiplexagem mostraram que uma dada linhagem de célula de CANARY pode expressar até três anticorpos diferentes sem afetar a sensibilidade da  
15           célula ao antígeno, inferindo que a expressão de 2 anticorpos diferentes contra o BoNT na mesma linhagem de célula de CANARY não deve ser um problema. Isso  
20           simplificaria o ensaio porque uma etapa de adição de microesfera não seria necessária. Entretanto, a preparação da amostra requereria a troca da solução contendo a toxina para meio de ensaio de célula.

          Uma aproximação final usa o mesmo conceito de CANARY, mas uma linhagem de célula diferente. Nessa modalidade, uma linhagem de célula única é gerada o que expressa o receptor Fc e aequorina. O receptor Fc se liga a porção Fc dos  
25           anticorpos, deixando as regiões de ligação do antígeno livres para se ligarem ao alvo. Anticorpos solúveis adicionados a essas células produzem uma "nova" linhagem de célula com a especificidade do anticorpo adicionado em 10 minutos. A adição de antígeno a essas células reticula os

receptores Fc, estimulando a emissão de luz da aequorina. Essa aproximação funciona com anticorpo monoclonal e com o policlonal contra *Bacillus anthracis*. Para a detecção de toxina, um anticorpo policlonal contra toxina (ou 2 anticorpos monoclonais contra toxina) pode ser adicionado a célula, e os receptores Fc, reticulados por antígeno solúvel.

Protocolos alternativos:

Melhoramentos adicionais podem ser verificados mediante a adição de um terceiro anticorpo solúvel ao ensaio. Dados publicados de Dr. J.D. Marks' laboratory (Nowakowski e colaboradores PNAS (2002) 99(17):11346-11350) mostra que a incubação de BoNT/A com um anticorpo monoclonal aumenta a afinidade aparente de um segundo anticorpo monoclonal contra um epítipo diferente por aproximadamente 100 vezes. Nessa modalidade, um anticorpo solúvel contra um terceiro epítipo na BoNT/A seria adicionado com as microesferas revestidas com anticorpos. A ligação do terceiro anticorpo a BoNT/A melhoraria a cinética de BoNT/A que se liga as microesferas.

Alternativamente, o anticorpo biotinilado não precisa estar presente nas microesferas quando é introduzido no ensaio. Anticorpo solúvel biotinilado e microesferas de estreptavidina podem ser adicionadas separadamente. Pode ser que isso melhore a ligação do anticorpo ao antígeno, e a elevada afinidade da interação biotina-estreptavidina ligará rapidamente o complexo antígeno-anticorpo as microesferas.

O uso de microesferas de proteína G ou microesferas de estreptavidina é conveniente. Qualquer suporte capaz de reticular os anticorpos pode ser usado, tal como dendrímeros, superfícies de tubo ou membranas. O anticorpo  
5 pode ser marcado com qualquer coisa que o atraia para uma superfície a partir da qual ele seja capaz de apresentar antígeno "polimerizado".

#### EXEMPLOS ADICIONAIS 2

Protocolos para Ensaio de Patógenos de Planta por  
10 CANARY

O tecido de planta é uma matriz complexa que pode afetar desfavoravelmente o ensaio de CANARY por inibir ou ativar não especificamente as células B. Portanto, métodos específicos foram desenvolvidos para processar tecido de  
15 planta para extrair agentes para detecção por CANARY.

#### Agentes bacterianos:

Para patógenos bacterianos de planta que bloqueiam o xilema, tal como, mas não limitado a, *Ralstonia solanacearum*, o seguinte é empregado para extrair o agente.  
20

- O tecido da coroa é recuperado mediante o corte da base do talo da planta na linha do solo.
- Ar comprimido, ou qualquer outro método que remova a sujeira do solo em excesso é usado pra limpar o talo.
- 25 • Um segundo corte é feito a ~ 1 cm a partir do corte da base para render um pedaço seccional cruzado.
- Com um perfurador circular levemente menor que o diâmetro do talo, retira a parte central da seção para remover a camada externa (< 1 mm de espessura).

- Colocar a parte central em um tubo de diâmetro apropriado contendo 1 mL de água destilada ou meio de ensaio de célula de CANARY (CO2I) e deixar de molho por 5 minutos.

5       • Remover a amostra da parte central do tubo, agitar o líquido.

- qualquer porção ou toda a amostra pode ser ensaiada como segue:

10       • Centrifugar a amostra a 10K - 18K RCF por 2 minutos em uma microfuge de rotores horizontais ("swing-bucket").

15       • Se água destilada foi usada para a extração, aspirar o sobrenadante e descartar, adicionar 0,5 mL de CO2I ao tubo, agitar e centrifugar a amostra a 10K - 18K RCF por 2 minutos em uma microfuge de rotores horizontais ("swing-bucket").

- Se CO2I foi usado na extração, nenhuma etapa de reposição é requerida.

20       • adicionar 0,02 mL de células de CANARY ao tubo de ensaio, centrifugar por 5 segundos e ler o sinal produzido no luminômetro.

Ver FIG. 100. O gráfico demonstra que a detecção de 100 cfu/mL (5ucf/teste de CANARY) de *Ralstonia solanacearum* em extrato de gerânio utilizando o protocolo listado acima e ilustrado na FIG. 101.

25       *Ralstonia* spp.:

Preparação de amostra relativamente pequena é necessária para tecido infectado com *Ralstonia*. Já que as bactérias bloqueiam o xilema (o sistema vascular da planta), "corrente bacteriana" (isto é, fluxo de bactérias

fora da extremidade de um talo) resulta quando a amostra de tecido é colocada sob a água. Isso permite recuperar a *Ralstonia* dos tecidos infectados sem ter que triturar a amostra, por meio disso, eliminando a necessidade de extrair as bactérias de detritos de planta que interferem potencialmente nos ensaios.

Para testar uma amostra de planta, gerânio nesse caso, o seguinte procedimento é realizado. A coroa, a área do talo logo acima do solo, é fatiada em seção cruzada e qualquer resíduo de solo é removido. Um segundo corte seccional cruzado é feito a ~ 1 cm acima do primeiro corte e uma amostra da parte central apenas levemente menor que o diâmetro é tomada. Esse processo deixa o xilema intacto, mas remove o revestimento externo do talo que interfere com o ensaio de CANARY. A amostra da parte central é, então, colocada em meio de extração por 5 minutos. Devido a fase de extração ser realizada em meio de ensaio de CANARY, etapas adicionais de CANARY para tornar as amostras compatíveis com CANARY são eliminadas, por isso, diminuindo o tempo de processamento. Foi possível detectar a *Ralstonia* em extratos de gerânio semeados, no mesmo nível de sensibilidade da *Ralstonia* individualmente em meio de extração (isto é, nenhum tecido de planta presente), indicando que a presença de extrato de planta não inibe o sinal de CANARY específico par *Ralstonia*.

Um sinal, claramente perceptível do de base (isto é, extrato de gerânio sem *Ralstonia*) é percebido dentro de 30 segundos a partir do momento que a amostra é colocada no luminômetro. O processo inteiro, incluindo a preparação da

amostra, pode ser completado em menos de 10 minutos. O ensaio é capaz de detectar níveis tão baixos quanto 5 cfu de *Ralstonia* por teste de CANARY. Resultados comparáveis foram obtidos do ensaio de CANARY quando oito diferentes  
5 isolados de *R. solanacearum* Rlbv1 vivos foram testados.

*Agentes virais:*

O grupo potivirus compreende o mais importante grupo de vírus de planta. O anticorpo monoclonal de reação de amplo espectro, PTY1, que é expresso em células B de  
10 CANARY reconhece um criptotopo (um epítipo não encontrado na superfície do virion, mas de preferência na cobertura de subunidades de proteína encontrada dentro do virion intacto). Isso apresenta aspectos especiais para CANARY que requer que o criptótopo no vírus seja exposto para ser  
15 acessível às células B. O método descrito aqui expõe o criptótopo mediante na ligação do potivirus a pristino, microesferas de poliestireno de 1-2 micron. Ver FIG. 156. A tecnologia também funciona com microesferas magnéticas de poliestireno. Na medida que o vírus se liga a microesferas,  
20 isso faz com que a cobertura do vírus se solte e exponha o epítipo. As microesferas também fornecem uma segunda vantagem para o ensaio de CANARY. O potivirus é uma longa partícula filamentosa, sinuosa (12 X 680 -900 nm) que não pode ser sedimentado por centrifugação rápida, de baixa  
25 velocidade. Mediante a fixação do vírus a microesferas que sedimentam muito rapidamente em uma baixa velocidade de giro ou que podem ser concentradas com um ímã, a sensibilidade do ensaio de CANARY para potivirus é muito aumentada. Nenhum dispositivo ou aparelho especial é

necessário para realizar a preparação da amostra de ensaio de CANARY que incorpora as microesferas.

Ver FIG> 102. O gráfico mostra a detecção de 5 ng/mL (0,05 ng/teste de CANARY) de BYMV, um potivirus, usando o processo de fixação de microesfera descrito acima. O método permite um tempo de 7 minutos da coleta-a-deteção. Testes em seis outras cepas de potivirus resultaram em limites de detecção similares.

*Phytophthora spp.:*

10 Duas linhagens de célula-B para detectar *Phytophthora*, um patógeno de planta tipo fungo de importância econômica considerável, foram desenvolvidas. Os genes para anticorpos foram extraídos a partir de hibridomas, PH 3812 e PH 4831, fornecido pela Neogen Corporation. Os anticorpos reconhecem a porção micelial do *Phytophthora spp.*.

15 Preparação de amostra para extração de *Phytophthora* é levemente mais complicado que para os outros dois patógenos previamente mencionados. Como os tecidos estão infectados com potivirus, este deve ser moído para liberar o organismo. Entretanto, *Phytophthora* é grande o suficiente para ser sedimentado por centrifugação, os co-sedimentos de detrito das planta, interferindo com o ensaio. Além dos grandes detritos gerados mediante a maceração do tecido de planta, partículas pequenas abundantes (ex. finas) também contaminam a amostra e não podem ser separadas do *Phytophthora* por filtração sem perda concomitante de patógeno. Os detritos interferem com o ensaio de CANARY mediante o bloqueio da detecção de luz e em alguns exemplos gera um sinal não específico. Foi novamente tomada uma

aproximação de ligação a microesferas para preparar amostras para extração de *Phytophthora* de tecidos de planta. Ao contrário do potivírus, que possui uma afinidade natural para poliestireno e se liga muito rapidamente a este sem qualquer tratamento especial, *Phytophthora* não se ligará a uma superfície de microesferas não tratadas. Portanto, *Phytophthora* e mycelia foram capturados em microesferas magnéticas revestidas com um segundo anticorpo específico para *Phytophthora* (isto é, reconhece um diferente epítipo do anticorpo expresso na superfície da célula B) permitindo que o patógeno seja retirado dos detritos. Usando uma caneta "pen pic" magnética, *Phytophthora* ligada a microesfera pode ser facilmente transferida para um tubo de ensaio e o ensaio de CANARY pode, então, ser realizado como indicado antes. A etapa de limitação de taxa na preparação de amostra é de 15 minutos requeridos para alcançar ligação suficiente de *Phytophthora* as microesferas revestidas com anticorpos.

Usando essa técnica, foi possível demonstrar resposta dose dependente para *Phytophthora infestans* e *Phytophthora capsici* mycelia, bem como a detecção de *Phytophthora infestans* no extrato de tubérculo de batata semeado. Os LODs não foram determinados para os testes com *Phytophthora*, já que as preparações de antígeno consistiram de mycelia moída colhida de culturas de *Phytophthora* de crescimento ativo. Diluições de 10 vezes de mycelia moída foram testadas até que o sinal retornou para níveis de linha de base (nenhuma *Phytophthora*).

*Protocolos para Ensaio de Patógenos Carregados pelo Sangue por CANARY*

Existem muitos parâmetros que influenciam a habilidade de CANARY para detectar patógenos carregados pelo sangue.

5 Como com outras matrizes complexas, o sangue contém ativadores e inibidores de ensaio de CANARY. A transmissão de luz é bloqueada porque o sangue total é opaco e os patógenos podem ser ou intracelulares ou estar na fase fluida de uma amostra de sangue. Adicionalmente, a

10 variabilidade entre amostras de doadores diferentes necessitou de desenvolvimento de um método de preparação de amostra universal que funcionará sem considerar o status do doador. Aqui são descritos métodos para preparação de amostra de sangue total, e dispositivos que superam todos

15 esses aspectos e ainda permitem a detecção de patógenos no sangue sem sacrificar a velocidade ou sensibilidade de ensaio de CANARY. O método usa tubos de separação de plasmas (PST) disponíveis comercialmente e centrifugação diferencial. Esse processo usa um gel tixotrópico com uma

20 densidade entre aquela do plasma e células do sangue, que forma uma barreira entre o plasma e as células quando o tubo é centrifugado. As bactérias e vírus presentes no sangue, sendo de menor densidade que o gel, permanecem na fase de plasma (fluida) durante a centrifugação. O plasma

25 pode então ser colhido e testado em CANARY.

Dispositivo e Protocolo para Detecção por CANARY de Patógenos Carregados por sangue na Fase Fluida:

Um dispositivo de amostra (FIG. 103) foi montado a partir de partes software de prateleira modificado

"Commercial off-the-shelf" (COTS) que possibilita a separação de amostras de sangue total em três etapas rápidas, simples. O dispositivo consiste de um tubo de coleta de sangue PST capilarmente heparinizado, disponível comercialmente. Um colar de conexão rosqueado é ajustado na tampa do tubo PST, a partir do qual o topo foi puncionado. Uma tampa obturadora é então colocado na metade do topo do colar. Um milímetro e meio de sangue total é coletado no tubo de separação de plasma heparinizado (etapa 1) e centrifugado por 90 segundos (etapa 2). A tampa obturadora é, então, substituída com um tubo rosqueado de ensaio de CANARY de 1,5 mL. O plasma contendo patógeno separado, com volume recuperado variando de 50 a 250 mL, é então coletado no tubo de ensaio por inversão (etapa 3). O plasma é misturado com 0,5 mL de meio de ensaio (um processo que reduz o efeito de um ativador de célula de CANARY que está presente no plasma) e a mistura é centrifugada para peletizar o patógeno. A amostra é, então, testada com células de CANARY específicas para patógeno como o protocolo padrão. O tempo total requerido da coleta de sangue até a detecção do patógeno é aproximadamente 5 minutos.

Ao usar o procedimento de três etapas simples detalhado acima, o limite de detecção de *Yersinia pestis* no sangue inteiro é 1000 cfu/mL (um ensaio de CANARY de 125 cfu) com um tempo total de coleta de sangue para detecção/identificação de agente em aproximadamente 5 minutos. Vide FIG. 103.

Dispositivo e Protocolo para a Detecção por CANARY de Patógeno Intracelular Carregado por Sangue:

As modificações desenvolvidas para o dispositivo para o isolamento de patógenos em fase fluida permite a recuperação das células brancas do sangue que contêm patógenos intracelulares, plasma e patógenos em fase fluida todos em uma etapa. Isso é realizado mediante a incorporação de um meio de isolamento de células brancas do sangue (Ficol-Diatrizoato) no dispositivo. Não há atualmente nenhum dispositivo comercial com essa configuração que é construída em pequena escala (isto é, capaz de separar somente 0.5 mL do sangue total).

Portanto, a unidade é montada neste como segue.

Em vez de um tubo de PST, (nenhum gel) um tubo de coleta de sangue capilar vazio é usado como o tubo base. Os seguintes componentes, na ordem em que eles estão listados, são então adicionados ao tubo (Nota: as quantidades são altamente relevantes para o dispositivo funcionar corretamente):

- 200 microlitros de Ficol-Diatrizoato (FD)
- 5 milímetros de gel de poliéster
- 100 microlitros de fosfato salino tamponado (PBS)
- 500 microlitros do sangue inteiro heparanizado ou EDTA

Vide a FIG. 104 para a configuração de tubo.

A configuração de tubo é idêntica àquela descrita para a separação de fase fluida e as mesmas modificações são feitas para acomodar o colar rosqueado e o tubo de ensaio descrito anteriormente. Uma vez que o sangue é adicionado ao tubo e tampado, o tubo é invertido várias vezes para

misturar o sangue com o PBS e, então, centrifugado por 90 segundos. O diagrama mais baixo na FIG. 104 indica a posição dos componentes pós-centrifugação.

A tampa obturadora é substituída pelo tubo de ensaio de CANARY e as células, o plasma e quaisquer patógenos livres são coletados pela inversão do dispositivo. Etapas adicionais são úteis nesse ponto, comparadas com o ensaio de recuperação de patógeno em fase fluida. As células brancas do sangue contendo patógeno devem ser lisadas para permitir a distribuição do agente de modo que isto seja acessível às células de CANARY. Primeiramente, o tubo é centrifugado em 11000 RCF por 1 minuto para peletizar as células brancas do sangue e quaisquer patógenos livres (fase fluida). O líquido é descartado e um agente lisante comercial é adicionado ao tubo de ensaio de CANARY que, a seguir, é agitado para misturar as células com o agente lisante. O tubo é incubado à temperatura ambiente por 5 minutos com agitação ocasional e, então, centrifugado outra vez a 11000 RCF por 1 minuto para peletizar os patógenos. O reagente lisante acima do pélete é descartado e 0,5 mL de meio de ensaio de CANARY são adicionados ao tubo que foi agitado e centrifugado outra vez. A amostra está agora pronta para o ensaio de CANARY e segue formato padrão de ensaio de amostra única, isto é, adicionar as células B, centrifugá-las por 5 segundos e registrar a saída de luz no luminômetro. O tempo total requerido para este ensaio de coleta para detecção é ~12 minutos.

O limite de detecção para *Y. pestis* no sangue total dopado é de 1000 cfu/mL quando a amostra de sangue é

processada pelo método descrito acima para se obter os patógenos intracelulares (vide FIG. 105).

### EXEMPLOS ADICIONAIS 3

#### Técnicas de colisão de Célula B de CANARY

5 A invenção descreve técnicas para a distribuição eficiente de células B CANARY úmidas ou de amostras de colisão a secos em centrifugação. Essas técnicas devem possibilitar um CANARY automatizado mais simples, mais barato baseado na minimização das partes móveis e o tempo  
10 de leitura de fóton separado.

#### Sumário da Descrição Técnica

O dispositivo incorpora técnicas usando a colisão de gotícula para maximizar o encontro rápido entre Células B de CANARY e os alvos contendo antígeno sob investigação.  
15 Diversas variações são descritas (listadas abaixo) e as técnicas experimentais e analíticas relevantes são descritas abaixo.

Técnica 1 "Pulverização de Célula B"

Técnica 2 "Ensaio de CANARY sem Centrifugação"

20 Técnica 3 "Colisão de Célula B de CANARY"

Técnica 4 "Conceito de distribuição de Célula B TCAN-3";

Técnica 5 "Atualização em colisão de célula B e de CANARY"

25 As técnicas descritas aqui se referem ao antígeno aerossolizado ou às gotículas de solução de antígeno colididos em uma superfície através de um elemento de colisão durante a coleta de antígeno. Subseqüentemente, as gotículas de Células B de CANARY são aerossolizadas e são

colididas na mesma superfície. Os métodos para a colisão são tanto de atomização mecânica quanto de pulverização da gotícula de antígeno colidida de um reservatório fluido (Técnicas 1 a 3) ou por meio de pressão diferencial criado a partir de uma perfuração rápida de um reservatório de fluido de célula B (Técnica 4). A técnica 5 descreve uma série de experiências projetadas para se verificar a capacidade de sobrevivência das Células B durante tais esquemas do aerossolização. Em todos os casos, as Células B encontram rapidamente o antígeno em uma superfície transparente, abaixo da qual está um fotodetector ou um medidor de ondas ótico para um fotodetector. Em cima da ligação de anticorpos de Célula B ao antígeno colidido, a luz é emitida e detectada pelo fotodetector. A relação sinal/ruído do sistema pode ser melhorada combinando a geometria ótica do medidor de ondas à geometria do bico de colisão, que pode ser usado para focalizar tanto o antígeno coletado assim como a solução atomizada de célula B.

Esse dispositivo ou os métodos descritos aqui podem ser usados para conduzir ensaios de CANARY sem centrifugação, reduzindo desse modo a complexidade de um instrumento automatizado de identificação e melhorando potencialmente o desempenho. Este usa a colisão em aerossol como parte de um imunoensaio rápido.

O ensaio de CANARY é um imunoensaio extremamente rápido, com o retardo de tempo preliminar resultando na técnica atual de centrifugar a solução de célula B a fim provocar a ligação para o antígeno. Este método introduz não somente um retardo de tempo, mas mais

significativamente, requer uma maior complexidade do dispositivo (motores, mecanismos de acoplamento e desacoplamento, codificação da posição e da velocidade, etc.) do que o método proposto aqui. A nova técnica usa a colisão de aerossol para deixar o anticorpo e o antígeno em contato. A complexidade reduzida pode igualmente resultar em sensores de identificação automatizados menores, menos caros do que os que existem atualmente, desse modo realçando seu uso como parte dos sistemas sensíveis proliferados.

Este dispositivo pode ser usado para o seguinte:

Sistemas da detecção/identificação de biodefesa, tanto de monitoramento contínuo quanto de trigger; cuidados médicos em seres humanos - caracterização de doença clínica e de estado da doença; caracterização da flora de base e de amostra ambiental; teste de alimento; saúde de animal, como será compreendido por uma pessoa versada na técnica.

#### Técnica 1: Pulverizador de célula B

##### Objetivo

O objetivo deste experimento era determinar se o uso de células B de pulverização com um atomizador seria um mecanismo alternativo de distribuição de célula B. O volume da célula distribuída, a viabilidade de célula, e a atividade foram medidos.

##### Projeto Experimental

Um método alternado de distribuição de um volume controlado de células de B foi investigado. A cinética de célula B pulverizada foi investigada para amostras líquidas e secas, e comparada às amostras testadas com 20 ul de

células B. Esses experimentos foram testados para contagens de célula, viabilidade, reprodutibilidade e atividade dentro de uma concentração, e níveis de base. O efeito de girar as células após a distribuição, e o volume típico de célula pulverizada também foi testado.

As células de B foram carregadas em um frasco atomizador pulverizante de Qosina de 3ml e usadas para distribuição de células às amostras que contêm Ba ou YP. Para determinar o volume de cada pulverizador, o frasco de pulverizador foi enchido com 2 ml de CO<sub>2</sub>I e um pulverizador foi liberado aos tubos eppendorf individuais até que o frasco de pulverizador ficasse vazio. Os tubos eppendorf foram centrifugados a 10.000 RPM por 30 segundos e o volume foi medido com uma pipeta. Para medir contagens de célula, as células B Ba foram carregadas no frasco de pulverizador e pulverizadas dentro de 5 tubos eppendorf individuais. Os tubos eppendorf foram centrifugados a 10.000 RPM por 30 segundos e o volume foi medido com uma pipeta. 10 ul de células foram então carregados para dentro do hemocitômetro para serem contadas. As contagens de célula foram comparadas às células contadas diretamente do tubo original da preparação da célula.

A fim de medir a atividade da célula B para amostras líquidas, 50 ul das amostras foram preparados com o agente nos tubos eppendorf de 1,5 ml, e centrifugados a 10.000 RPM por 2 minutos. Para amostras secas, 5 ul de agente, diluído em água, foram preparados nos tubos eppendorf de 1,5 ml, centrifugados a 10.000 RPM por 2 minutos, e deixados secar durante a noite. Um pulverizador de células B, tipicamente

com um volume de  $34 \pm 8 \text{ ul}$ /pulverização, foi pulverizado diretamente no tubo. As amostras então foram giradas em uma mini-centrífuga por 5 segundos e lidas com um luminômetro de Berthold.

## 5 Resultados

Os resultados indicam que cada frasco de pulverizador pode ser carregado com 2 ml de células B e pode ser pulverizado 45-47 vezes. Cada pulverizador distribui  $34 \pm 8 \text{ ul/spray}$  ( $n = 47$ ). Enquanto as células contadas diretamente a partir de tubo original produzem em média  $3,2 \times 10^5 \pm 8,0 \times 10^4$  células/ml ( $n = 5$ ), as células pulverizadas mostraram uma média reduzida  $1,3 \times 10^5 \pm 2.9 \times 10^4$  células/ml ( $n = 5$ ). Conseqüentemente, o número de células/amostra distribuída resultou em  $5392 \pm 954$  ( $n = 5$ ) por células pulverizadas e  $5283 \pm 76$  ( $n = 5$ ) por células distribuídas com a pipeta de 20 ul.

A FIG. 106 é um gráfico padrão de Ba com 20 ul de distribuição de célula. 50ul de amostras Ba preparadas em meio CO<sub>2</sub>(I) e testadas com 20ul de células B. Os resultados indicam o baixo fundamento e um LOD de 50 cfu Ba ( $n = 2$ ).

A FIG. 107 é um gráfico de pulverizador de célula B Ba. 50ul de amostras Ba preparadas em meio CO<sub>2</sub>(I) e testadas com número variado de pulverizadores de célula B. Os resultados indicam o fundamento aumentado com os 2 pulverizadores comparados à 20ul de distribuição de célula. O número de pulverizadores não afetou a intensidade máxima dos 50.000 cfu Ba ( $n = 1$ ).

A FIG. 108 é um gráfico Padrão de Ba com 1 - pulverização de distribuição de célula. 50ul de amostras Ba

preparadas em meio CO<sub>2</sub> (I) e testadas com um pulverizador de células B. Os resultados indicam bases similares com 20ul de distribuição de célula e o LOD de 5.000 cfu. 50 e 500 cfu Ba mostraram a possibilidade de 50 % de detecção (n = 2).

A FIG. 109 é um gráfico de Padrão de Ba: detecção de 500 cfu de Ba com 20 ul de células B. 50 ul de amostras de Ba com 500cfu de Ba foram preparadas em meio de CO<sub>2</sub>(I) e testadas com 20 ul de células B. Resulta em 100% de detecção de 500cfu mesmo com base mais alta do que o visto normalmente (n = 3).

A FIG. 110 é um gráfico de Pulverizador de célula B Ba: detecção de 500 cfu de Ba com 1 - pulverização de células B. 50 ul de amostras de Ba com 500 cfu de Ba foram preparados em meio de CO<sub>2</sub>(I) e testados com 1 pulverizador de células B. Os resultados indicam a detecção de 50% de 500cfu e de uma base 2-3 x mais alta (n = 14).

A FIG. 111 é um gráfico de pulverizador de célula B Ba: detecção de 500 cfu de Ba com 1 - pulverização de células de B e nenhuma rotação. 50 ul de amostras de Ba com 500 cfu de Ba foram preparados em meio de CO<sub>2</sub>(I) e testadas com 1 pulverizador de células B. As amostras não foram giradas por 5 segundos antes da leitura. Os resultados indicam que nenhuma célula interage com o agente tendo por resultado a detecção de 0 % de 500 cfu Ba (n = 3).

A FIG. 112 é um gráfico do pulverizador de célula B de YP: detecção de 500 cfu de YP com 20ul de células B. 50 ul de amostras de YP com 500 cfu de Yp foram preparados em meio de CO<sub>2</sub>(I) e testados com 20ul de células B. Os

resultados indicam uma base típica e uma detecção de 100% de YP 500 cfu (n = 4).

A FIG. 113 é um gráfico de pulverizador de célula B de YP: detecção de 500 cfu de Yp com 1 - pulverização de células B. 50 ul de amostras de Yp com 500 cfu de Yp foram preparados em meio de CO<sub>2</sub>(I) e testados com 1 pulverizador de células B. Os resultados indicam uma base ligeiramente aumentada com a detecção de 100 % de 500cfu de YP (n = 8).

A FIG. 114 é um gráfico de Yp padrão: detecção de 500 cfu de Ba com 20 ul de células B. 50 ul de amostras de Yp com 500 cfu de Yp foram preparados em meio de CO<sub>2</sub>(I) e testados com 20ul de células B. Resulta em 100% de detecção de 500cfu com uma base típica (n=7).

A FIG. 115 é um gráfico de Pulverizador de célula B de Yp: detecção de 500 cfu de Yp seco com 20ul de células B. 5ul de amostras de Yp com 500 cfu de Yp foram preparados em dH<sub>2</sub>O, secos durante a noite, e testados com células B 20ul. Os resultados indicam a detecção de 100 % de 500 cfu de Yp (n=10).

A FIG. 116 é um gráfico de pulverizador de célula B de Yp: detecção de 500cfu de Yp seco com 1 - pulverização de células B. 5ul de amostras de Yp com 500 cfu de Yp foram preparados em dH<sub>2</sub>O, secos durante a noite, e testados com 1 - pulverização de células B. Os resultados indicam uma base mais alta, mas a detecção de 100% de 500 cfu de Yp (n=10).

Conclusão:

Os resultados indicaram que a pulverização de células B é um método apropriado para a distribuição de célula B. Embora as contagens de célula tenham diminuído com a

pulverização, o volume maior permite um número similar de células liberadas por amostra. A pulverização de células BBa continua a mostrar capacidades de detecção com 50 cfu e 500 cfu, mas em 50 % de detecção. É possível que otimizando as condições de pulverização, possivelmente com uma concentração mais alta de células B ou células mais novas, essa atividade possa ser recuperada. Experimentos de pulverização de célula BBa também indicam que 5 segundos da etapa de giro é ainda requerido para a atividade apropriada de célula B. Interessantemente, a pulverização de célula BYp não afetou a atividade de célula B tanto, quanto com a detecção de Ba. Os níveis de base permaneceram similares e 500 cfu de Yp mostrou 100 % de detecção. Os efeitos de células B foram também testados no líquido e em amostras secas. Primeiramente, a detecção de 500 cfu de Yp na forma úmida ou seca não mudou com 20 ul de distribuição de célula. Embora, os experimentos tenham aumentado para células pulverizadas comparadas à distribuição 20 ul de célula com amostras secas de Yp, a detecção de 500 cfu de Yp seco permaneceu mostrando detecção de 100 %.

Esses resultados sugerem que as células B podem manter LODs similares após passarem por alguns mecanismos de distribuição de bomba e podem se opor a alguma das pressões vistas em ambientes de orifício pequeno e capilares. A distribuição de células B pulverizadas pode facilitar experimentos de campo onde a armazenagem e distribuição está em uma parte e não requer pipetas.

Técnica 2: Ensaio CANARY sem Centrifugação

O ensaio CANARY. CANARY é um bioensaio sensível e rápido. Este usa linhagens modificadas de células-B que fluorescem ao se ligarem com antígenos. Células de antígeno são centrifugadas ou colididas em uma superfície. Em seguida, células-B são centrifugadas nessas células e a fluorescência é medida por um luminômetro. Vários projetos (por exemplo, BCAN ou TCAN) estão usando CANARY para detecção em campo de patógenos, combinando coleta de aerossol e colisão com o ensaio de CANARY.

#### 10 Sistema de CANARY Anterior.

Na versão atual dos detectores de campo de CANARY, o aparelho de centrifugação embaraçoso e o aparelho óptico delicado são necessariamente combinados em um espaço pequeno. Essa exigência incomoda o projeto e a construção desses detectores. A eliminação de centrifugação reduz custos de projeto, custos de construção e custos de manutenção somados a melhora de confiabilidade. Foi descrita uma técnica alternativa usando colisão.

#### Técnicas alternativas para colidir células-B

20 Para evitar gastos e complicações de projeto devido a centrifugação, vários métodos foram sugeridos como alternativas para mover as células B para a superfície de ligação. Esses incluem manipulação de microesferas magnética dentro de células, termoforese, eletroforese, e  
25 manipulação acústica. Cada desses métodos requer um desenvolvimento e refinamento de nova tecnologia no sistema de CANARY.

Técnica proposta

É descrita aqui uma técnica que usa tecnologia de CANARY aplicada de uma maneira nova, especificamente a ligação de células B a antígenos mediante colisão. Essa técnica usa uma colisão bem similar a aquela usada em BCAN ou TCAN. A solução de célula B é pulverizada através do bico de colisão de célula de antígeno. Devido a sua maior massa, mesmo que as células B estejam em solução elas ainda colidem na superfície de colisão. Isso é descrito em mais detalhes na próxima seção. O spray tem a mesma taxa de fluxo usada para o bioaerossol. Portanto, a mesma bomba usada para coletar o aerossol pode acionar a colisão de células B.

#### A Física da colisão de células B

A colisão de uma partícula através de um líquido é similar a de uma partícula através de um gás. Quando linhas de corrente de fluido mudam de direção repentinamente devido a obstruções físicas, partículas maciças no fluido atravessam as linhas de corrente e colidem com a obstrução. O parâmetro adimensional que descreve a verossimilhança da colisão é o número de Stokes. Este é a razão da distância de parada de uma partícula para a dimensão de um obstáculo. O número de Stokes é aproximadamente:

$$Stk \approx \frac{\tau U}{D},$$

Onde  $U$  é a velocidade de fluido que se move em direção ao obstáculo,  $D$  é o tamanho do obstáculo e  $\tau$  é o tempo de relaxação da partícula. O tempo de relaxação é uma função do diâmetro da partícula, densidade da partícula e

viscosidade do fluido. Para fluido que flui para fora de um bico na superfície de colisão, D é o diâmetro do bico.

A equação para o diâmetro de corte da partícula em um bico de colisão é:

5

$$F_{DEP} = 2\pi r^3 \epsilon_m \operatorname{Re}[K(\omega)] \nabla E^2 \quad \nabla E^2 \propto \frac{V^2}{d^3} \quad K(\omega) = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \quad (2)$$

onde  $Stk_{50}$  é uma constante ( $\sim 0,5$ ),  $\eta$  é a viscosidade do fluido (0,01 P para água e 0,0002 P para o ar) e Q é a taxa de fluxo. Para BCAN, Q é 2 lpm e D é 0,1 cm. Então a  $d_{50}$  calculada para a água é 6 microns e para o ar é 0,8 microns.

Portanto, a mesma bomba de colisão pode ser usada para colidir uma partícula no ar e para colidir uma célula B em solução.

Os novos métodos possuem várias vantagens. A nova técnica elimina a etapa de centrifugação de células B. O método é rápido - leva apenas segundos para colidir as células B. Não existem partes que se movem próximas a PMTs, o que significa que os PMTs terão uma vida operacional longa e que eles podem ser posicionados para um sinal mais sensível. Esse detector é barato e rigoroso comparado a um detector com base em centrifugação. É fácil de construir mediante modificação de um BCAN ou TCAN existente.

Técnica 3: Colisão de células B de CANARY

Objetivo:

Para desenvolver um método de distribuição alternativo para dispositivos de campo de CANARY que não envolvem uma etapa de centrifugação.

#### Projeto experimental

5           Protocolos de CANARY anteriores requerem uma etapa de 5 segundos de centrifugação em 500 g para distribuição de células B. Entretanto, a centrifugação de amostras limita a efetividade de dispositivos de campo de CANARY mediante o ajuste de várias restrições de projeto em um sistema  
10 automatizado que inclui componentes delicados, tais como células B e PMTs. O novo método descrito aqui elimina movimento extra de partes mediante a colisão do agente e de células B, na medida que são colididas de maneira similar aos sistemas BCAN e TCAN.

15           Este difere do método atual no qual apenas o agente é colidido. Conseqüentemente, a única parte móvel é uma válvula para atomização de células B, que é colocada em alguma distância a partir da superfície de ligação.

          No novo método, gotículas de células B são dispersas  
20 na corrente de colisão. Os experimentos da técnica 1 "spray de células B" mostra que as células B sobrevivem pelo menos a algumas formas de atomização. Os cálculos da técnica 2 "Ensaio de CANARY sem centrifugação", mostram que células B colidirão através de uma solução aquosa que move em taxas  
25 de fluxo usadas no BCAN. Devido ao BCAN possuir um corte de colisão de 1 micron, gotículas de células B com diâmetros de 10 microm e acima colidirão facilmente no fluxo de ar provido por uma bomba de BCAN usando a mesma taxa de fluxo. Como o tamanho da gotícula é muito menor que o bico de

BCAN, perdas no bico serão negligenciadas. O quanto às células B sobrevivem à colisão pode ser determinado apenas experimentalmente.

O novo método de pulverização remove partes móveis para as três operações: colisão de agente, colisão de células B e medições PMT. Conseqüentemente, isso simplifica as exigências do projeto para o dispositivo de campo onde as células B podem ser armazenadas em um reservatório único em uma certa distância. Um simples mecanismo de válvula no impactador é usado porque o fluxo de ar não precisa ser separado das células B adicionadas.

Essa técnica requer um dispersante capaz de aerossolizar 10 ou 20 microns de gotícula. Nebulizadores de colisão, o dispersante padrão de laboratório para bioaerossol, possui baixa eficiência para gotículas maiores que 5 microns. Dois atomizadores alternativos foram considerados. O primeiro é um pulverizador de dose medida disponibilizado por Qosina e desenvolvido para a indústria cosmética. Experimentos Isome indicam que tamanhos de partículas são de 10 microns ou maiores e produzem um pulso de aerossol. Esses pulverizadores custam \$1 cada. O outro tipo de atomizador para esses tamanhos de partícula é o atomizador ultra-sônico usado para fluxos contínuos. Duas empresas que produzem sistemas de atomizadores ultra-sônicos são Sono-tek e Soaner. Esses sistemas custam de \$ 7,5K a \$ 15K.

Um experimento para testar o atomizador Qosina com protótipo de BCAN é estabelecido como segue (vide FIG. 117). O disco será colocado em um anel de colisão, que foi

construído para experimentos de BACAN. Este consiste de um bico de colisão, um poço mantendo o disco de colisão e uma ponta será conectada através de um tubo para um rotômetro, filtro HEPA e bomba para operar próximo a 5lpm. Um tubo  
5 conectará a entrada do anel a um "T", uma extremidade a qual será aberta ao ambiente de ar e a outra para o atomizador Qosina, que conterà uma solução de células B. Um PMT será colocado embaixo do disco de vidro. Devido ao PMT ser sensível a luz, o anel de colisão e o PMT serão  
10 colocados em uma caixa preta. Tubulações escuras conectarão a saída do rotômetro e a entrada do "T". Durante o teste, simulador de agente será marcado no disco de colisão de vidro e o disco colocado no anel. A seguir, a bomba será ligada e as células B pulverizadas a partir do atomizador.  
15 Nesse ponto, se as células B sobrevivem a atomização de colisão em quantidade suficiente, um sinal luminescente é esperado a partir do PMT. Um teste de suporte será colidir células B em um disco livre de agente para provar que a colisão sozinha não causa luminescência nas células B.

20       Técnica 4: Conceito de distribuição de célula-B de TCAN-3

Objetivo:

O atual biosensor TCAN-2 incorpora válvulas de trompa de COTs para controlar a liberação e distribuição de  
25 células B. Essa válvula de trompa é cara e volumosa. Adicionalmente, uma mola dentro da válvula de trompa tem que ser removida antes de ser usada para manter a válvula aberta durante a etapa de centrifugação. Essa técnica propõe um esquema alternativo para células B liberadas e

distribuídas com base em uma aplicação simples de princípio de Bernoulli.

Conceito:

O conceito proposto utiliza a bomba de coleta de aerossol para aspirar células B no trajeto do aerossol a partir de um reservatório de líquido. Isso é realizado mediante a vedação do reservatório de células B com um lacre de folha de metal que é fechado durante a coleta de aerossol. Após a coleta de aerossol o lacre é perfurado, resultando em uma pressão diferencial ( $\Delta P$ ) entre o trajeto do aerossol e o reservatório.

Esse conceito é baseado no princípio de Bernoulli que estabelece que a pressão de um fluido varia inversamente com a velocidade; portanto, o aumento na velocidade do ar produzirá uma diminuição da pressão. Os princípios para esse conceito são idênticos a atomizadores comuns. A maior parte dos atomizadores funciona mediante a geração de um fluxo de ar em um reservatório de líquido. O ar em movimento rápido diminui a pressão de entrada, aspirando o líquido no trajeto do ar com base na pressão diferencial.

Princípio de Bernoulli:

$$\frac{P}{\rho} + \frac{1}{2}V^2 + gz = \text{const.}$$

P = pressão;  $\rho$  = densidade do fluido; V = velocidade;

G = aceleração da gravidade; z = altura;

Antes de perfurar o lacre. As células B devem permanecer no reservatório porque a pressão da extremidade traseira ( $P_2$ ) se equilibrará com a pressão de entrada ( $P_1$ ) com base na lei dos gases ideais. Ao assumir que a temperatura permanece a mesma, na medida em que o plugue de fluido é puxado para o trajeto do aerossol, o volume de ar ( $V_2$ ) também aumentará resultando em uma diminuição da pressão da extremidade traseira ( $P_2$ ). A pressão da extremidade traseira se equilibrará com a pressão de entrada até que o lacre é rompido. Após o lacre ser rompido a pressão da extremidade traseira se equilibrará com a pressão atmosférica adjacente.

Lei dos Gases Ideais:

$$PV = nRT$$

15 Parâmetros de Projeto

Existem vários experimentos chave que necessitam ser completados. Os parâmetros do projeto chave incluem a determinação do diâmetro e geometria ideais do canal de reservatório. Esse diâmetro afetará a tensão superficial da interface líquido-gás. A pressão diferencial devida a tensão superficial em um tubo capilar é como segue:

(tensão superficial =  $\gamma = 0,073$  N/m para a água)

$$\Delta P = 2 \gamma / \text{raio}$$

25 Como o raio é diminuído, a pressão necessária para aspirar o líquido do reservatório é aumentada.

Conclusões:

Esse método para liberação e distribuição de célula B simplificará o projeto do atual CD sendo usado em TCAN-2. Esse método também pode diminuir o custo e o tamanho do CD,

resultando em um modo mais barato e mais fácil para produzir partes. Essa técnica também pode ser aplicável a aproximações não centrífugas de distribuição de células B também descritas aqui.

5           Técnica 5: Experimentos adicionais de colisão de célula B e CANARY

O método descrito aqui tem como alvo as células B em antígeno mediante a colisão de gotículas no substrato de antígeno. Isso é particularmente adequado para a colisão de  
10 CANARY a seco. Células B são colocadas no mesmo local que o antígeno porque elas são colocadas pelo mesmo mecanismo.

O excesso de estresse a que as células B estão sujeitas é devido a aerossolização. Especificamente, o estresse ocorre durante o transporte do aerossol e a  
15 colisão do aerossol. Durante a geração de bioaerossol, as células podem ser sujeitas a estresses mecânicos severos e carregar. Durante o estágio de transporte, a gotícula pode estar sujeita a evaporação do solvente e mudanças na concentração do soluto. Esses efeitos podem levar a  
20 dessecação, toxicidade de oxigênio e desequilíbrio da pressão osmótica. Durante o estágio de colisão, as partículas são mais uma vez sujeitas ao estresse mecânico. Todos esses efeitos podem inativar a célula B, impedindo seu uso como um detector de antígeno. As células B não são  
25 inativadas por aerossolização durante a análise de FACS, nem a viabilidade das células é afetada. Durante a análise de FACS/citômetro de fluxo, máquinas de FACS dispersam as células uma de cada vez em gotículas (isto é, um aerossol) e as gotículas são ópticamente analisadas e então

(opcionalmente) coletadas em tubo para estudo adicional. As células B também sobrevivem por horas após colisão em tubos secos, mesmo na presença de íons quelato. Apenas 10% das células de são perdidas após uma hora. Portanto, 5 suficientes células B para detecção de CANARY colidirão em menos de um segundo.

#### Estudo de teste

Para estudo adicional do efeito da aerossolização em 10 células B, um antígeno pode ser colocado no fundo de um tubo de teste separador FACS. Células B de CANARY podem então ser processadas através da máquina de FACS. O tubo de teste pode então ser analisado em um luminômetro para emissão de fóton por células B de CANARY. Um controle 15 negativo omitiria o antígeno no tubo. Além disso, a colisão de antígeno e células de CANARY juntos em um tubo pode ser testada.

#### EXEMPLOS ADICIONAIS 4

##### Sensor de 16 canais:

20 É descrito aqui um sensor de 16 canais refinado e melhorado, o que provê o mesmo nível de sensibilidade tal como visto com um sistema de canal único (FIG. 121). Esse protótipo portátil é adequado para teste e avaliação externa. Especificamente, isso permite a medição simultânea 25 de 16 amostras usando um canal de recolhimento de luz. O sensor consiste de um rotor que mantém 16 tubos de ensaio horizontalmente, igualmente distribuídos em torno de sua circunferência, e é acionado por um motor em torno do eixo vertical. Um único elemento de detecção de fótons fixado,

nesse caso um PMT, é posicionado na superfície plana do rotor, logo adiante da rota dos tubos durante a rotação. Desse modo, cada um dos tubos é, seqüencialmente e respectivamente, posto em proximidade imediata ao PMT, 5 permitindo que a produção de luz seja amostrada em cada passagem. Finalmente, um interruptor ótico consistindo de uma fonte ótica (um LED infravermelho) e um detector (um fototransistor) são usados para controlar a contagem de fótons detectados e a reorganização de dados em 16 campos, 10 cada um associado com uma amostra específica.

Uma medição única consiste de:

1. Preparar 16 amostras (e/ou controles) em tubos de ensaio individuais;
2. Introduzir uma alíquota de células B em cada um dos 15 tubos usando qualquer um de uma variedade de métodos incluindo, mas não limitado a, transferência manual, transferência automática, cápsula ou pacotes de blister;
3. Carregar os tubos de ensaio em um rotor;
4. Localizar as células B no fundo dos tubos usando um 20 girador centrífugo rápido 5 (segundos) com força centrífuga relativamente alta (RCF) ( $\sim 2000$  g);
5. Reduzir a velocidade do rotor para uma faixa entre 10 e 120 rpm enquanto perdurar a medição (1-2 minutos), cada tubo sendo amostrado uma vez por ciclo;
- 25 6. Gerar uma série de tempo de contagem de fóton para cada amostra para exibição e/ou entrada em um algoritmo de computador para avaliação.

FORMATOS DE ENSAIO NÃO CENTRÍFUGO

Outros formatos de ensaio que são compatíveis com um sensor portátil compacto tendo como alvo aplicações clínicas, rápidas ("point-of-care") e de posicionamento avançado ("forward-deployed") também são descritas aqui. Em geral, o objetivo durante a experimentação foi identificar formatos que podem simplificar tanto o procedimento de ensaio de CANARY e quanto o hardware requerido, enquanto mantém tanto quanto possível a velocidade e a sensibilidade. Especificamente, o foco foi na caracterização do desempenho de procedimentos de ensaio alternativo que podem reduzir ou eliminar as exigências das etapas de centrifugação, já que estas são atualmente as principais responsáveis pelo consumo de energia e complexidade industrial.

Um número de aproximações foi experimentalmente avaliado visando formatos de ensaio que empregam manipulação de alvos ligados a superfície, canais microfluídicos, montagens para mechas de material absorvente, filtração ou captura por microesfera magnética. O uso de montagens de fluxo lateral e captura por microesferas magnéticas, entre outras coisas, são descritos em maiores detalhes abaixo.

Métodos de manipulação física de partículas ligadas a superfície (a.k.a. "pinhead")

Essa é uma família de métodos não centrífugos para usar células B de CANARY inspirado por (e originalmente testado usando) pinos planos comuns. Na prática, o pino plano pode ser substituído por qualquer superfície sólida adequada que satisfaça 3 critérios básicos: 1) a superfície

não estimula fluxos de cálcio de células B, 2) a superfície é capaz de receber e reter/ligar alvo de um modo que isso não altere a habilidade dos anticorpos em células-B de CANARY de se ligar ao alvo ligado, e 3) a superfície é responsável pela manipulação física que a coloca em contato com uma camada de células B (células emissoras) na superfície de um recipiente de reação. Geralmente, as partículas a serem testadas podem ser coletadas no "pinhead" a partir de amostras de ar ou líquidas por vários meios (FIG. 122) e subsequentemente apresentadas a uma alíquota de células B sedimentadas (FIG. 123); se a amostra coletada inclui o antígeno para o qual as tais células expressam anticorpos, um fraco sinal de luz pode ser gerado e coletado por um luminômetro sensível.

Nos métodos centrífugos de CANARY, as partículas incluindo (bactérias, vírus ou toxinas) a serem testadas são localizadas em um local de amostra ou mediante a colisão de ar (como no BCAN) ou, no caso de amostras líquidas, mediante uma pré-rodagem centrífuga longa ( $\geq 2$  minutos), dureza ( $\geq 10$  K RCF). (Qualquer uma dessas preparações de amostra concentra efetivamente as partículas em um pequeno volume próximo do local da amostra). As células de CANARY são então introduzidas no volume de amostra e, após uma breve ( $\sim 5$  segundos), leve ( $\sim 500$  RCF) rodagem para distribuição de células, são conduzidas para o local de amostra onde podem encontrar partículas.

Devido ao curto tempo que se leva para mover as células B para a superfície da amostra, esses encontros acontecem em um curto espaço de tempo; a resposta luminosa

resultante das células B é sincronizada criando um sinal mais claramente identificável na forma de um padrão reconhecível de fótons detectados.

Os métodos de pinhead apresentam uma concentração similar de partículas e células B na, ou próxima da, superfície: partículas a serem testadas são coletadas na superfície (o pinhead) por vários meios, e essa superfície é manipulada fisicamente para uma camada fina de células B arranjada previamente (gravitacionalmente sedimentada, pré-rodada, ou crescida de forma aderente a uma superfície). Isso resulta, novamente, em uma estimulação sincronizada de células B, resultando em um sinal forte o suficiente.

A primeira avaliação experimental desses conceitos consistiu de secar uma amostra de 2  $\mu$ L contendo quantidades conhecidas de simuladores antigênicos em pinheads e introduzi-los nas alíquotas sedimentadas (por centrifugação) de várias linhagens de células B (cada linhagem sendo uma população de células B que expressam anticorpos a um agente conhecido ou simulador). Uma resposta forte foi observada em casos mal combinados (FIG. 124 mostra uma resposta dose típica).

A segunda avaliação experimental consistiu de coleta eletrostática de esporos de Bs em um modo similar ao da FIG. 122 (b). Usando concentrações aproximadamente similares de esporos de Bs no ar, uma velocidade de fluxo de ar fixa e variação do tempo de coleta, uma dose resposta foi observada quando os pinos coletados foram introduzidos a tubos contendo células B sedimentadas que expressam anticorpos Bs (FIG. 125).

### Ensaio duplo de microesfera magnética

É descrito aqui um ensaio que tira proveito de dois conjuntos de microesferas. Um conjunto é específico para células B de CANARY, enquanto que o outro conjunto é específico para um agente particular. Essas microesferas específicas para agente podem ter uma afinidade geral para uma classe de agente particular (por exemplo, bactérias gram +/-, vírus, proteínas, DNA, etc.) (vide, por exemplo, o US2005/0118575 e patente U.S. N° Série 11/056,518, dos quais os ensinamentos são incorporados aqui como referência), ou podem ter atividade específica para um agente único. Na FIG. 127, um ensaio de CANARY padrão foi realizado em paralelo com um ensaio duplo de microesfera. Microesferas magnéticas específicas para *Y. pestis* foram misturadas com uma série de diluições de agente *Y. pestis* por 5 minutos. Após 5 minutos, as microesferas magnéticas foram puxadas para o fundo do tubo de ensaio juntamente com alguma *Y. pestis* ligada, e o sobrenadante foi removido. Células B marcadas magneticamente foram adicionadas a amostra e puxadas para o fundo do tubo. A localização do agente e de célula B com microesferas magnéticas forneceu, até agora, sensibilidade similar àquela da centrifugação.

### Formatos com material absorvente ("Wicking formats")

É descrito aqui um ensaio de CANARY em dispositivos que possuem materiais de filtro e materiais absorventes em camadas para realizar transporte de amostra fluida e localização de antígeno sem centrifugação. A construção básica do dispositivo e ilustrações mostrando sua

habilidade para localizar partículas dimensionadas de esporos é mostrada nas FIGS. 128 e 129.

A FIG. 130 mostra sinais de CANARY resultantes para os ensaios centrífugos padrões e ensaio de fluxo lateral usando o mesmo agente e amostras de células. Esses e outros experimentos mostraram que embora as células B possam ser usadas em ensaio de fluxo lateral, os níveis de ruído de sinal tendem a ser mais baixos que um ensaio de centrifugação, desse modo, abaixando o LOD total. A amplitude de sinal reduzida indica que esse formato é menos efetivo ou na localização de partículas de antígeno ou na sincronização de apresentação de células, na medida em que elas atingem as partículas no material de filtro, ou ambas. Níveis de base aumentados são também observados. Estes variam na intensidade com diferentes materiais absorventes e taxas de fluxo, e são geralmente correlacionados com materiais e taxas de fluxo espera-se resultar em estresse mecânico aumentado nas células B devido a adesão de superfície aumentada e forças de cisalhamento do líquido. Possíveis soluções incluem usar células B selecionadas para alta resistência a estresse mecânico, usar baixos níveis de detergentes para diminuir o estresse por cisalhamento do sistema, diminuir a espessura e tamanho da zona de captura para assegurar que todos os antígenos capturados possam ser vistos por células B, e diminuir o estresse perpendicular ("sheer stresses") mediante a redução do comprimento da tira de mecha de material absorvente. O dispositivo inicial usou um filtro de 0,2  $\mu$ L para captura mas pode ser combinado com microesferas para capturar partículas menores que 0,2  $\mu$ m.

## EXEMPLOS ADICIONAIS 5

Modalidades de Sensor de Bioaerossol de CANARY automatizado

É descrita aqui a configuração de coleta de aerossol por colisão inercial com identificação CANARY em sensores automatizados para demonstrar a coleta e identificação de patógeno carregado pelo ar em tempo tão pequeno quanto 90 segundos. O tempo de resposta mais rápido atualmente relatado por outros dispositivos automatizados de identificação e coleta de bioaerossol é maior que 18 minutos, logo isso representa um melhoramento de mais de uma ordem de magnitude comparado com o estado da técnica. Duas modalidades com base nesses projetos, os sensores BCAN e TCAN (FIG. 131) foram previamente construídos e testados, e estão descritos aqui materiais chave, métodos, e dispositivos que são incorporados na próxima geração da tecnologia de CANARY que foi chamada PANTHER (Analisador de Patógeno para Tratar Emissões Ambientais, FIG. 131).

Detalhes chave da tecnologia central são descritos nas figuras relacionadas (FIG. 131-137) e suas legendas e pode ser resumido como segue:

1) Ar contendo partículas de aerossol para serem analisadas é puxado através de um disco de 4,75" de diâmetro com características que conduzem e aceleram o fluxo de ar através de 16 canais ou mais com geometrias que fazem com que as partículas de aerossol arrastadas colidam com a superfície do disco em áreas bem definidas que são responsáveis pela condução da análise de CANARY.

2) Células B de CANARY são armazenadas em uma placa em 16 ou mais alíquotas individuais que podem ser automaticamente liberadas usando um número de mecanismos disponíveis e distribuídas por meio de um giro breve (menos 5 que 5 segundos) para cada local de coleta de aerossol.

3) O giro força o contato entre as células B de CANARY e partículas de aerossol coletadas e luz é emitida a partir de qualquer uma das amostras que contém o patógeno alvo de células B de CANARY. O disco é transparente para o 10 comprimento de onda de luz emitido nas zonas de reação e a luz emitida é coletada e quantificada usando um dispositivo de detecção de luz por contagem de fóton (ex. um tubo fotomultiplicador).

4) Discos múltiplos como descritos acima são 15 carregados em um dispositivo que provê o armazenamento, transporte, processamento, e análise de dados. A operação desse instrumento proverá coleta e análise de patógenos que é capaz de identificar patógenos carregados pelo ar em tempo tão pequeno quanto 90 segundos.

## 20 APÊNDICE

### Definições de Símbolo/Acrônimo

AC	corrente alternada
AFB	Base da Força Aérea
ATP	Adenosina trifosfato
BAWS	Sensor de Advertência de Agentes Biológicos
Bcl2111	Bcl2-tipo 11
Bmf	Fator de modificação de Bcl2
BoNT/A	Neurotoxina Botulínica A
BoNT/A Hc	Neurotoxina Botulínica A de cadeia pesada

CANARY	Análise Celular e Notificação de Riscos e Produções de Antígenos
CCD	Dispositivo de carga acoplada
CDC	Centro para Controle de Doença
COTS	Commercial of-the-shelf (software de prateleira)
CPT	Tubo de preparação de célula
CRET	Transferência de energia de ressonância química
DC	Corrente contínua
DEP	Dieletroforese
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DoD	Departamento de Defesa
Ebs	Corpos elementares
EGFP	Proteína fluorescente verde intensificada
FcγRI	Receptor Fc gama I
FMD	Doença de pé-e-boca
GADD45β	Inibidor de crescimento em β indutíveis com DNA danificado
GFP	Proteína verde fluorescente
GST	Glutathione transferase
HA	Hemaglutinina
HBSS	Solução salina balanceada de Hanks
Hells	Helicase, linfóide específica
Hist1H1c	Histonas H1c
HSF1	Fator 1 choque-calor
IFNγ	Interferon gama
LD50	Dose letal 50 %

LOD	Limite de detecção
NiCd	Níquel - cádmio
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação de cadeia de polimerase
Pcd11g1	Morte de célula programada 1 ligante 1
PMT	Tubo fotomultiplicador
PST	Tubo de separação de plasma
RCF	Força centrífuga relativa
RLU	Unidade de luz relativa
TCA	Ácido tricloroacético
Tx-100	Triton X-100
USAMRIID	Instituto de Pesquisas Médicas de Doenças Infecciosas do Exército dos Estados Unidos
VEE	Eqüinos encefalíticos venezuelanos

Enquanto esta invenção foi particularmente mostrada e descrita com referência as modalidades preferidas da mesma, deve ser entendido pelos especialistas no assunto, que várias mudanças na forma e detalhe podem ser feitas aqui sem se afastar do escopo da invenção englobado pelas reivindicações anexas.

Os ensinamentos relevantes de todas as referências, patentes e pedidos de patentes citados aqui são incorporados por referência no seu todo.

### REIVINDICAÇÕES

1. Método para detectar um antígeno solúvel em uma amostra **caracterizado** pelo fato de compreender:

5 a) agregar uma célula emissora à amostra, onde a célula emissora inclui um receptor e uma molécula emissora que emite um fóton em resposta à ligação de um antígeno alvo na amostra ao receptor;

10 b) detectar uma emissão de fóton, sendo a emissão de fóton indicativa de um antígeno solúvel na amostra.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato do antígeno solúvel ser um ácido nucléico, uma toxina, um peptídeo, um produto químico, um vírus ou uma combinação destes.

3. Aparelho para detectar um antígeno solúvel em uma amostra, **caracterizado** pelo fato do antígeno estar ligado por um receptor em uma célula emissora, a referida célula emissora compreendendo um receptor e uma molécula emissora que emite um fóton em resposta à ligação de um antígeno alvo na amostra ao receptor, sendo que o aparelho detecta a emissão do fóton, detectando conseqüentemente um antígeno solúvel em uma amostra.

25 4. Aparelho de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato do aparelho ser portátil manualmente.

5. Método para detectar uma partícula alvo em uma amostra de ar **caracterizado** pelo fato de compreender:

a) comprimir a amostra de ar em um substrato;

- b) agregar uma célula emissora ao substrato, onde a célula emissora inclui um receptor e uma molécula emissora que emite um fóton em resposta a uma partícula alvo no receptor;
- 5 c) detectar a emissão de fóton, sendo a emissão de fóton indicativa de uma partícula alvo na amostra de ar.
6. Método de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato do substrato ser uma cabeça de
- 10 alfinete (minúsculo?).
7. Método de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato da célula emissora ser uma célula B.
8. Método de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato do receptor ser um anticorpo.
- 15 9. Método de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato do anticorpo ser um anticorpo antiimunoglobulina.
10. Método de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato do receptor ser um receptor Fc.
- 20 11. Método de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato da partícula alvo na amostra de ar ser um produto químico, uma partícula explosiva ou uma partícula biológica.
- 25 12. Aparelho para detectar uma partícula alvo em uma amostra de ar **caracterizado** pelo fato de compreender:
- a) meios para comprimir uma amostra de ar em um substrato, sendo a célula emissora agregada ao referido substrato e na qual a referida célula

emissora inclui um receptor e uma molécula emissora que emite um fóton em resposta à ligação de uma partícula alvo ao receptor.

5 b) Meios para detectar a emissão de fóton, nos quais a emissão de fóton é indicativa de uma partícula alvo na amostra de ar.

13. Aparelho de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que o aparelho é portátil manualmente.

10 14. Método para detectar uma patogenicia em plantas **caracterizado** pelo fato de compreender:

- 15 a) preparar uma amostra de planta incluindo uma patogenicia de planta;
- b) agregar uma célula emissora à referida amostra de planta, onde a célula emissora inclui um receptor e uma molécula emissora que emite um fóton em resposta à ligação de uma patogenicia em planta em uma amostra ao receptor;
- 20 c) detectar a emissão de fóton, sendo a emissão de fóton indicativa de uma patogenicia em planta na amostra.

15. Método para detectar uma patogenicia em uma amostra clínica, **caracterizado** pelo fato de compreender:

- 25 a) preparar uma amostra clínica para ser testada quanto à patogenicia;
- b) agregar uma célula emissora à amostra, onde a célula emissora inclui um receptor e uma molécula emissora que emite um fóton em resposta

à ligação de uma patogenicia na amostra ao receptor;

c) detectar a emissão de fóton, sendo a emissão de fóton indicativa de uma patogenicia na amostra.

5           16. Método de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato da amostra clínica ser um esfregaço nasal, uma amostra de urina, uma amostra de saliva ou uma amostra de sangue.

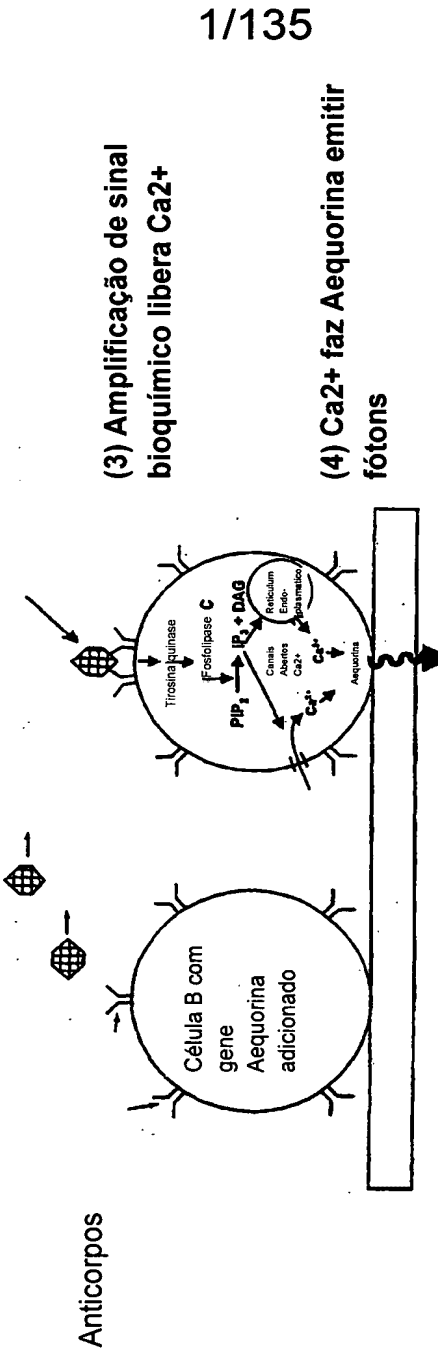
10           17. Método de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que a patogenicia é uma bactéria, um vírus ou uma toxina.

## CONCEITO DO SENSOR

**\*Resposta em segundos**    **\* Alta sensibilidade**    **\*Células B distintas específicas para bioagentes diferentes**

(1) Bioagentes em líquido de cultura de célula

(2) Anticorpos de célula B ligados a bioagentes



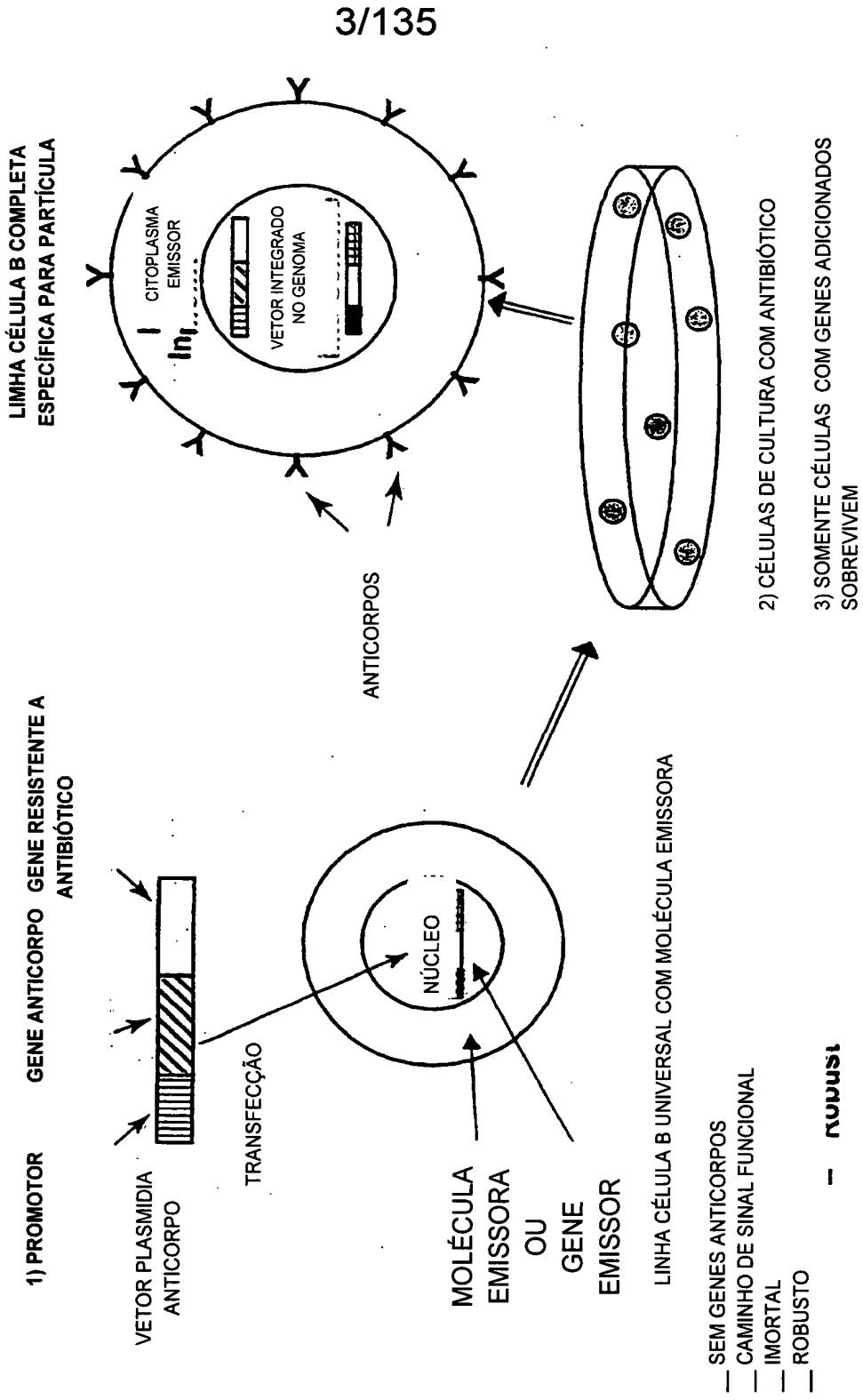
1/135

\* Alguns bioagentes podem infectar no nível de partícula 1-10

\* Sensor sensível ao ID rápido necessário para detectar ataque de nível baixo na presença de contagem de fundo bioológica típica

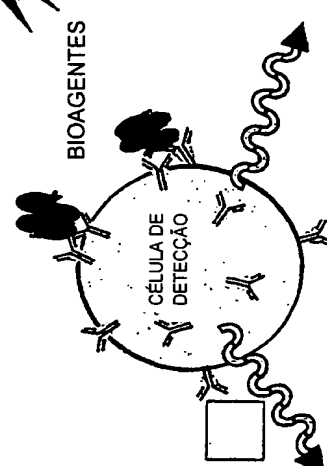
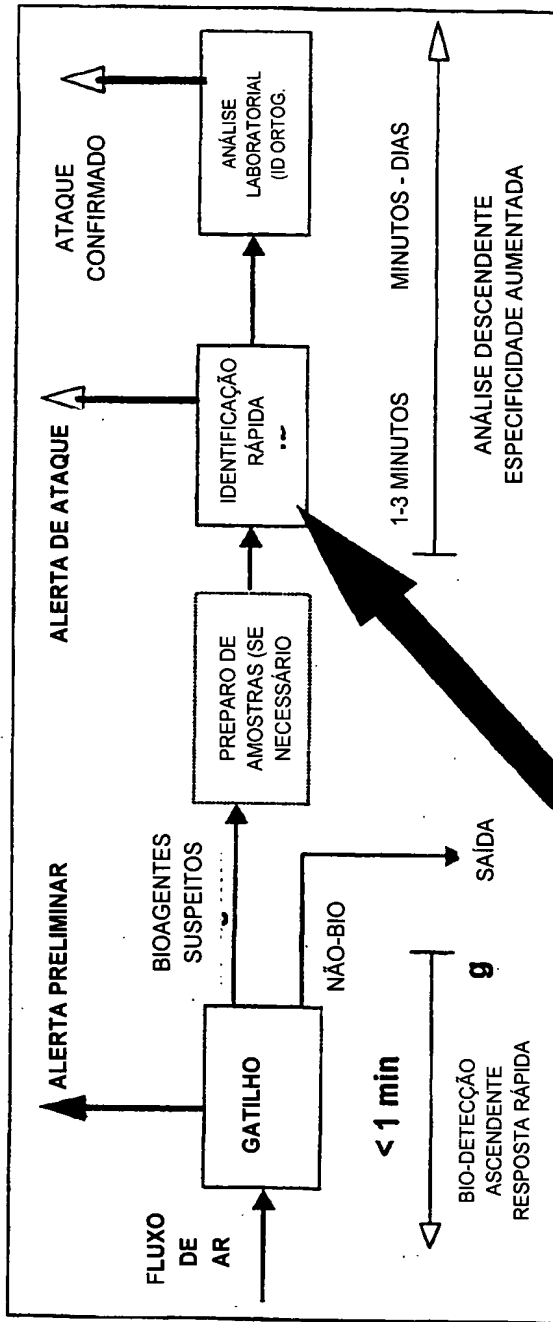
FIG. 1

# CRIAÇÃO DE LINHAS CELULARES SENSORIAIS



**FIG. 3**

# Arquitetura do Biosensor Genérico



**OBJETIVOS DO PROGRAMA**  
**\*SENSOR DE DETEÇÃO SENSÍVEL E RÁPIDO**  
**\*FORTE E ROBUSTO CONTRA CONTAMINAÇÃO**

FIG. 2

# BAWS INTEGRADO / CONCEITO DE SENSOR

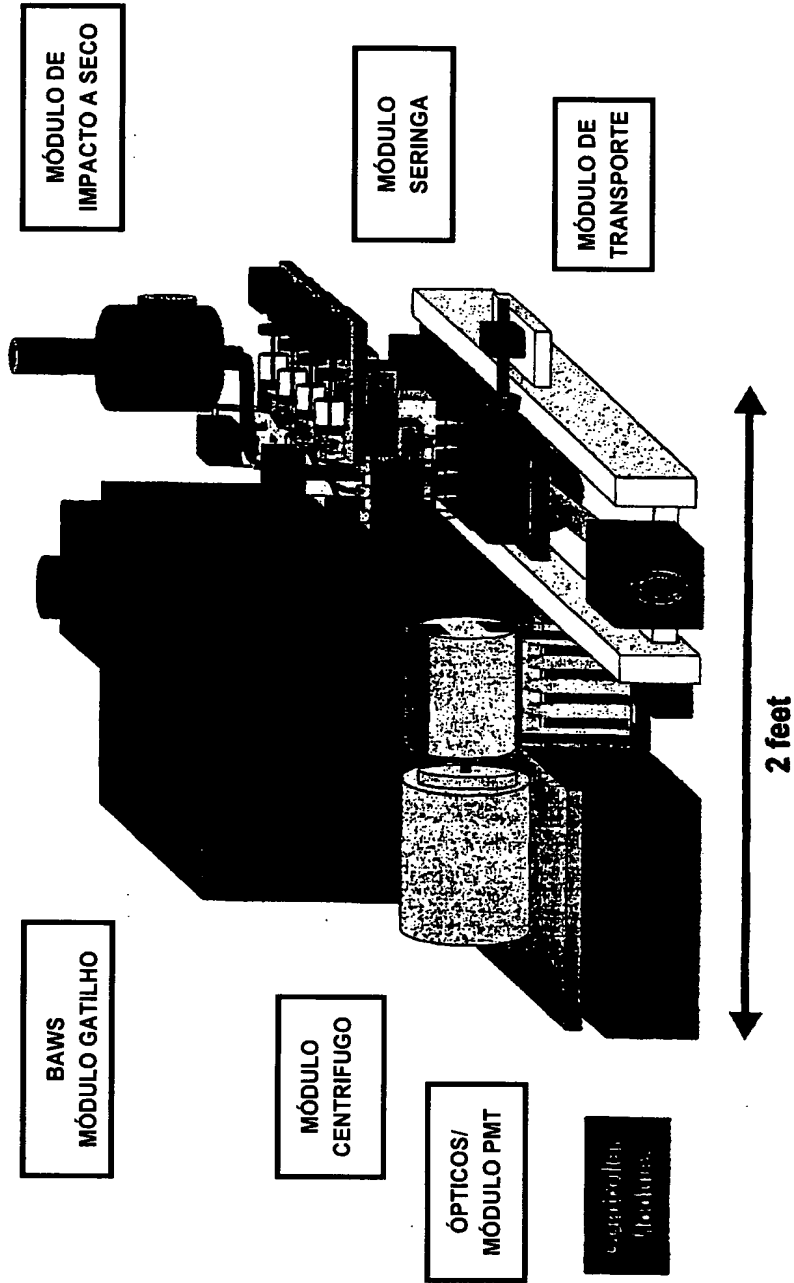


FIG. 4

# RESPOSTA DE CÉLULA B AO VIRUS DA AFTOSA

\*TESTES REALIZADOS NA UNIDADE BL-3 EM PLUM ISLAND (USA)

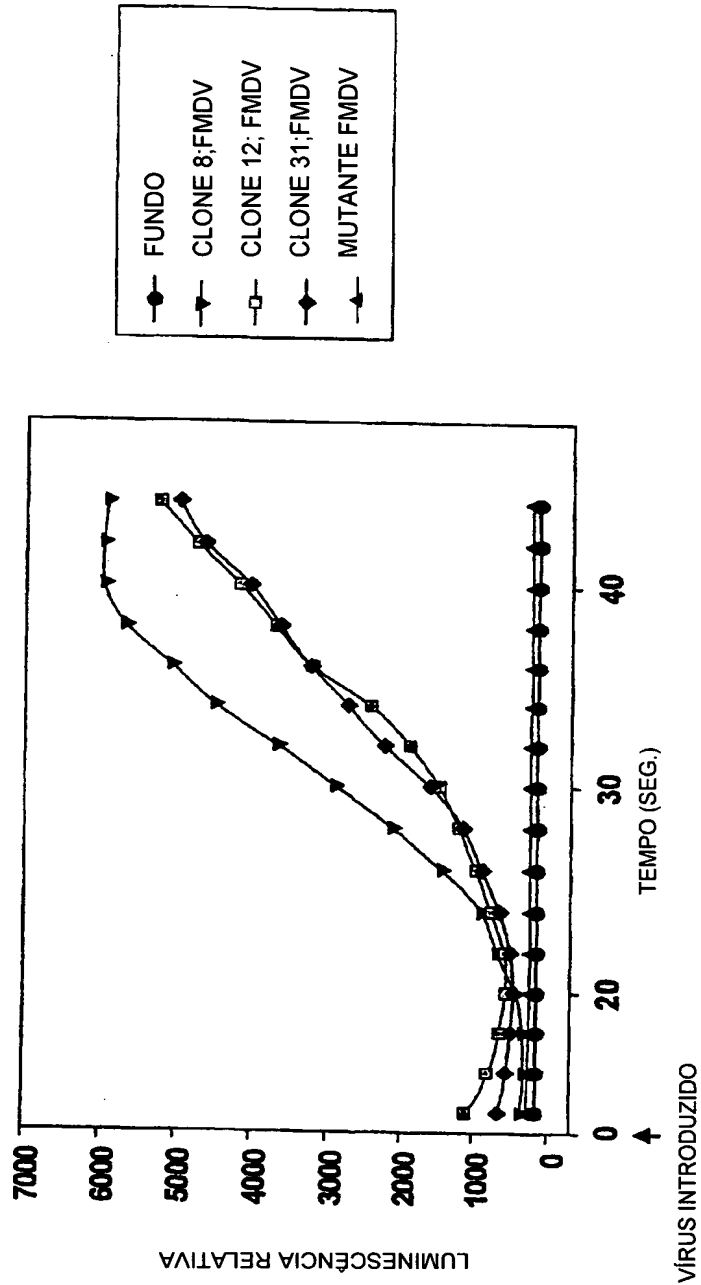
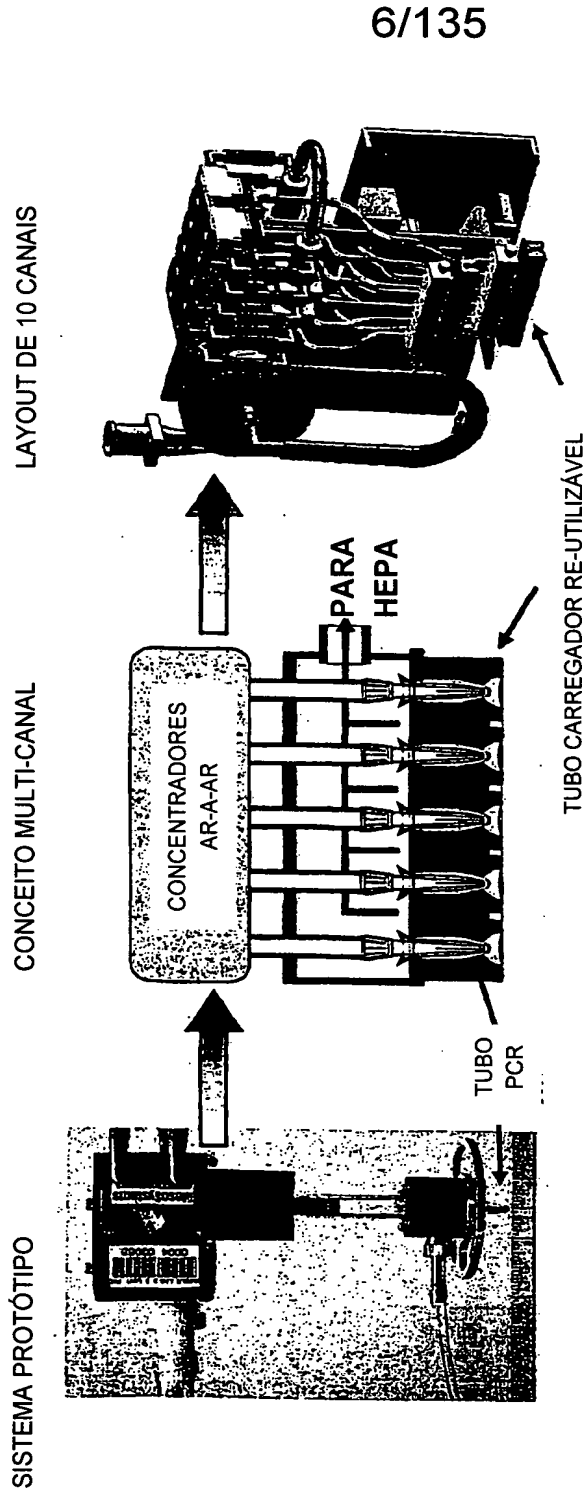


FIG. 5

# CONCEITO DE MÓDULO DE IMPACTO A SECO



- \* CONCENTRADOR AR-A-AR CONCENTRA PARTÍCULAS DENTRO DO VOLUME DE AR REDUZIDO
- \* CARREGADOR RE-UTILIZÁVEL FIXA TUBOS PCR QUE PODEM SER USADOS DIRETAMENTE COMO AMOSTRAS CONFIRMATÓRIAS

**FIG. 6**

# APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENO ATIVO VIA CENTRIFUGAÇÃO

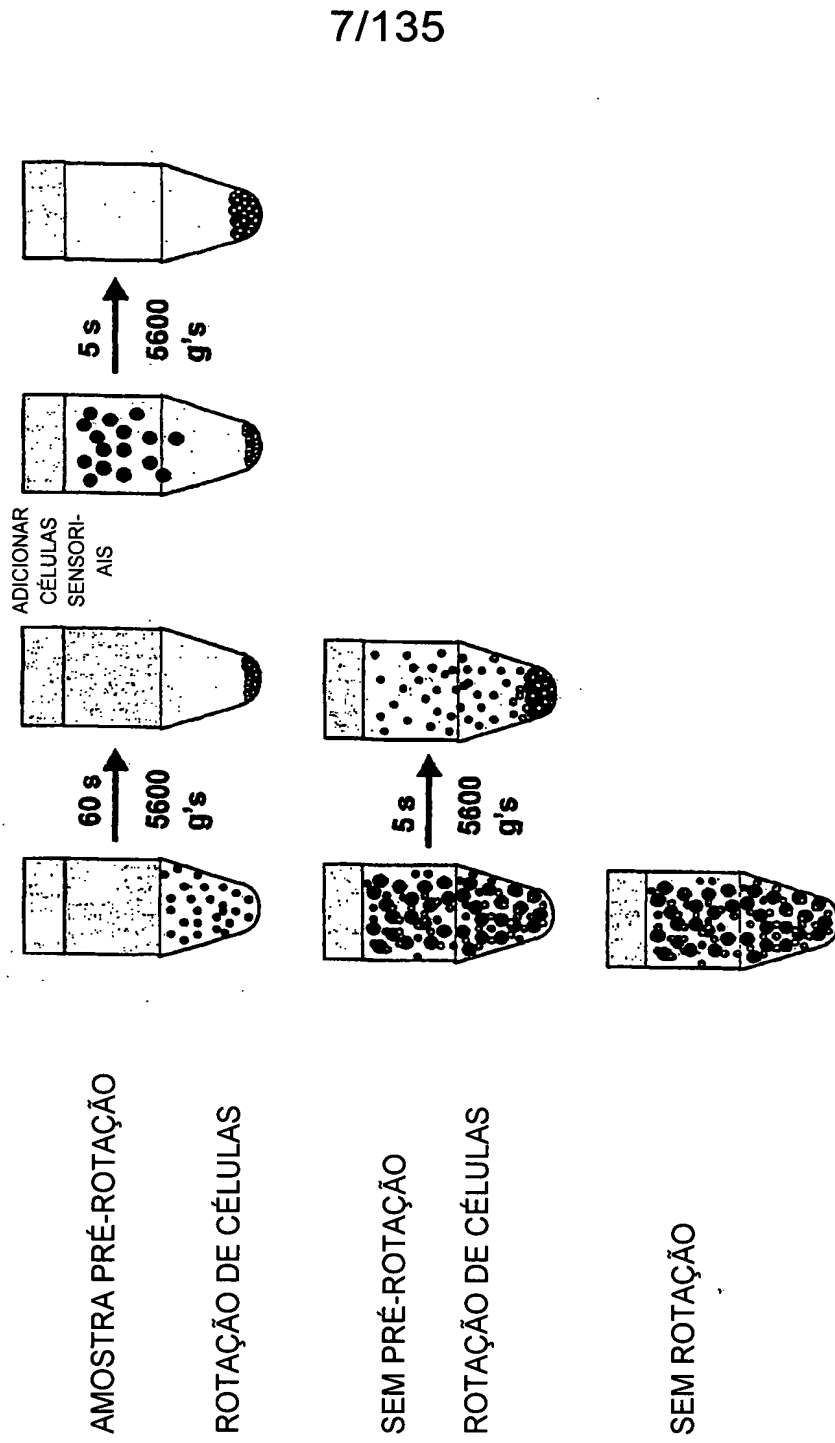
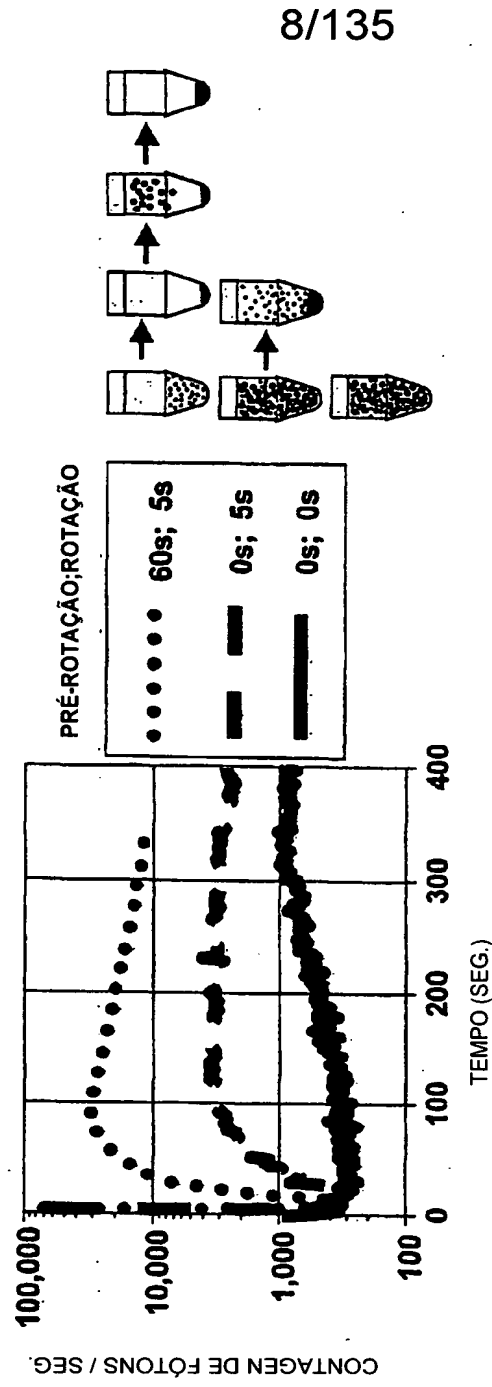


FIG. 7

## APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENO ACTIVO AUMENTA SINAL



\* OS RESULTADOS MOSTRADOS SÃO PARA CONFRONTO COM  $5.3 \times 10^5$  CÉLULAS DE TULAREMIA MORTAS

\* CÉLULAS USADAS FORAM PREVIAMENTE AVALIADAS COMO DE RESPOSTA NEGATIVA USANDO ENSAIO PADRÃO DE LUMINOMETRO (EQUIVALENTE AO CASO SEM CENTRIFUGAÇÃO)

FIG. 8

## CONCEITO DE DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULA AUTOMATIZADA

\* CÉLULAS SENSORIAIS COMPATÍVEIS COM  
DISTRIBUIÇÃO USANDO BOMBAS DE SERINGA,  
PIPETAS AUTOMÁTICAS, ETC.

\* TIPOS DIFERENTES DE CÉLULAS SENSORIAIS EM  
SERINGAS INDIVIDUAIS PRÉ-CARREGADAS.

\* CONTROLE AMBIENTAL PARA MANTER  
DESEMPENHO DE CÉLULA B.

UMA GOTÍCULA DE CÉLULA B POR TESTE  
ADICIONADA APÓS COLETA DE AEROSSOL.

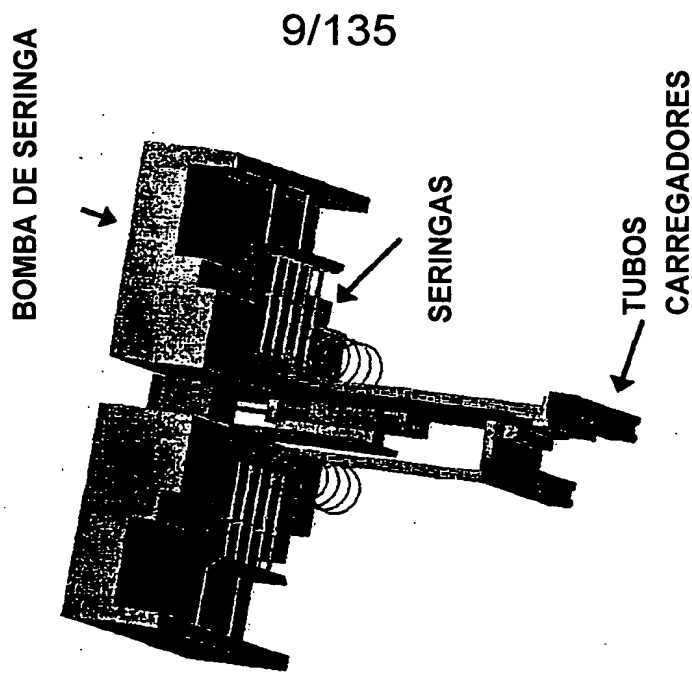


FIG. 9

# DOSE DE RESPOSTA PARA TULAREMIA MORTA

10/135

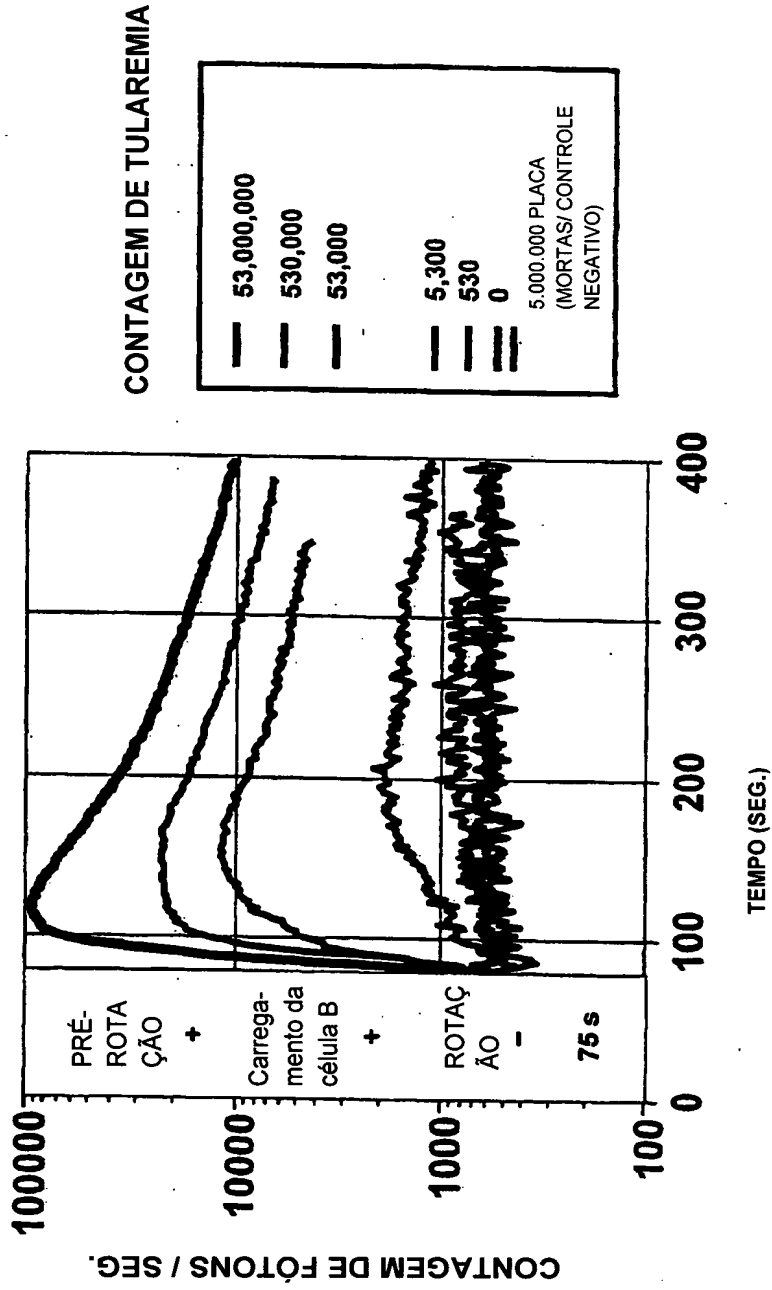
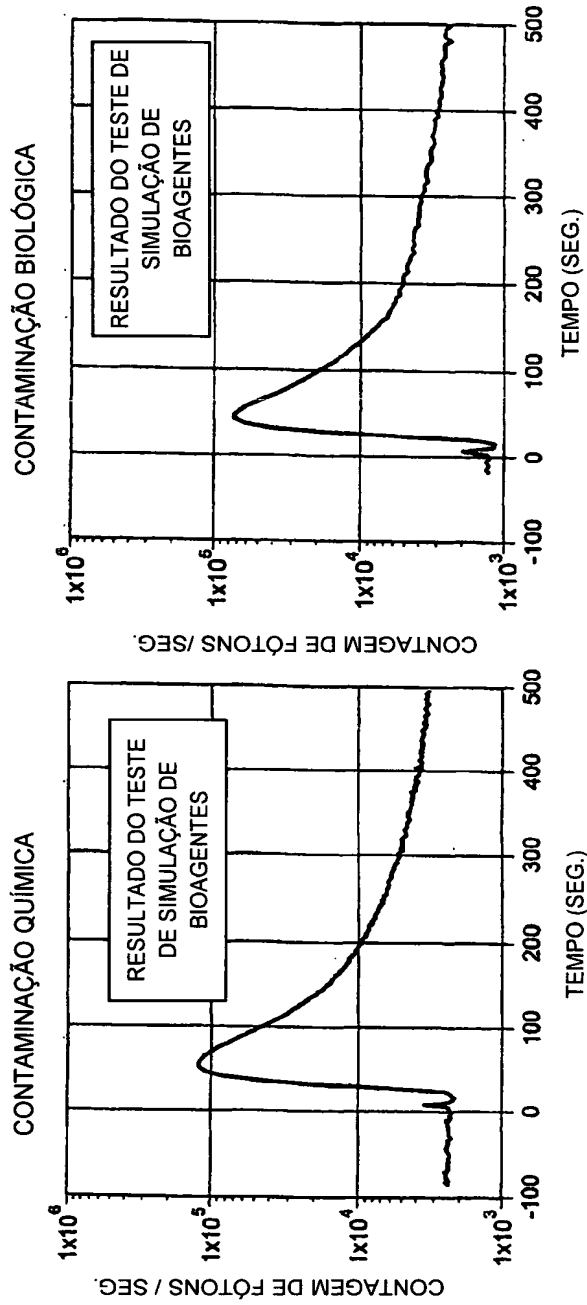


FIG. 10

# RESISTÊNCIA A CONTAMINAÇÃO

## CÉLULAS B SÃO RESISTENTES A CONTAMINAÇÃO



11/135

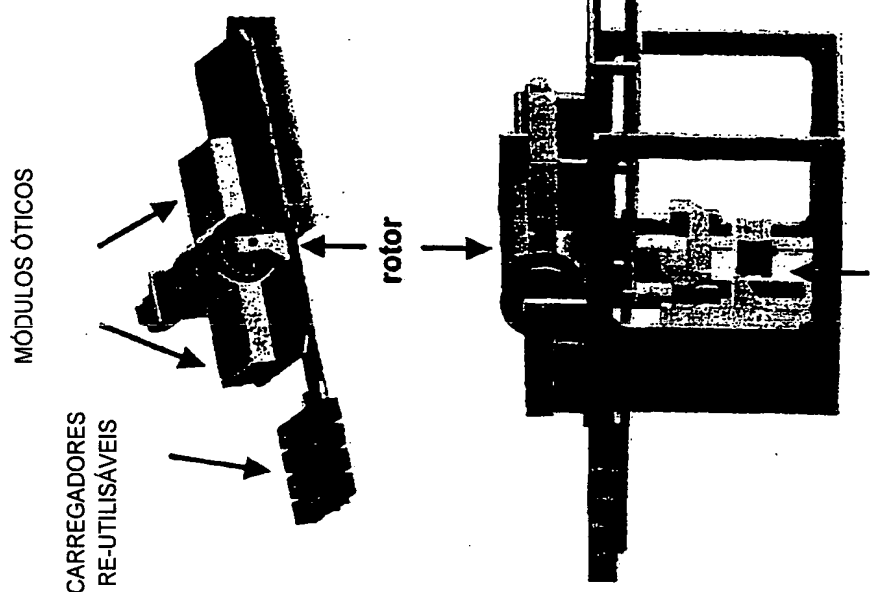
\* EXPOSIÇÃO DURANTE 1 Hr. A EXTRAÇÃO

\* CONTAMINAÇÃO PELA BACTERIA  
 $10^7$  E COLLI

FIG. 11

# CONCEITO DE MÓDULO DE CENTRIFUGAÇÃO AUTOMATIZADA

12/135



\* CÉLULAS FORÇADAS NAS PARTÍCULAS COM ROTAÇÃO DE 5 SEGUNDOS

\* MOTOR INDEXADO ALINHA AMOSTRAS COM MÓDULOS ÓTICOS PARA COLETA DE SINAL

\* ARRANJO LINEAR PRÓPRIO PARA AUTOMAÇÃO E MONTRAGEM

MECANISMO DE CARGA DO CARREGADOR

FIG. 12



# CONCEITO DE IDENTIFICADOR DE CÉLULA B

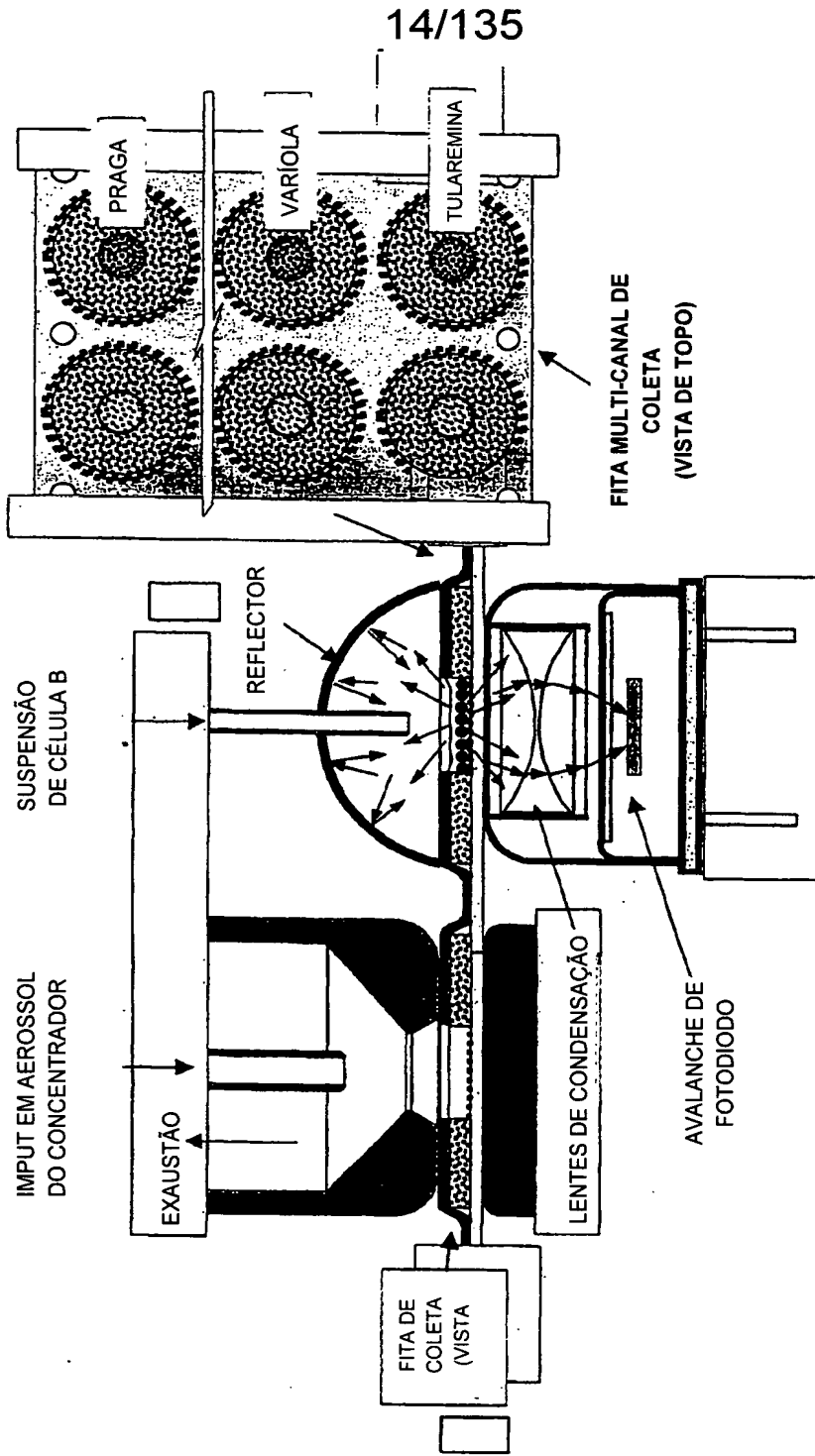


FIG. 14

## CONCEITO DE MÓDULO - ÓTICO/PMT

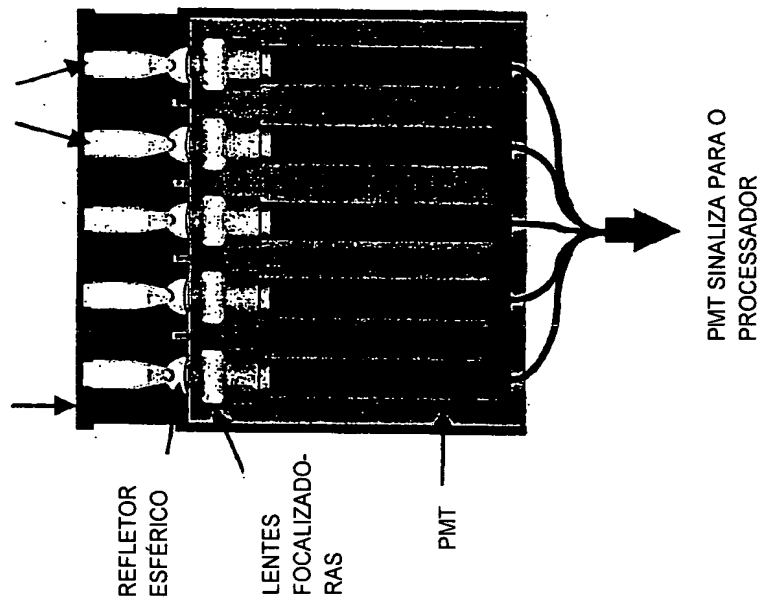
\* FORMAS COMPLEMENTARES  
AUXILIAM ALINHAMENTO E  
PROTEGEM ÓTICOS DE LUZ DIFUSA

\* REFLECTORES E LENTES  
INTEGRADAS MELHORAM COLETA  
DE LUZ

\* 10 TESTES SIMULTÂNEOS  
USANDO DOIS DESTES MÓDULOS  
POR ROTOR

\* SINAL OB TIDO MENOS DE UM  
MINUTO APÓS COLETA DE  
AMOSTRA SECA

CARREGADOR RE-UTILIZÁVEL TUBOS PCR DE 0.2 ml



15/135

FIG. 15

# CONCEITO DE CENTRÍFUGA MULTI-CANAL SIMPLES

17/135

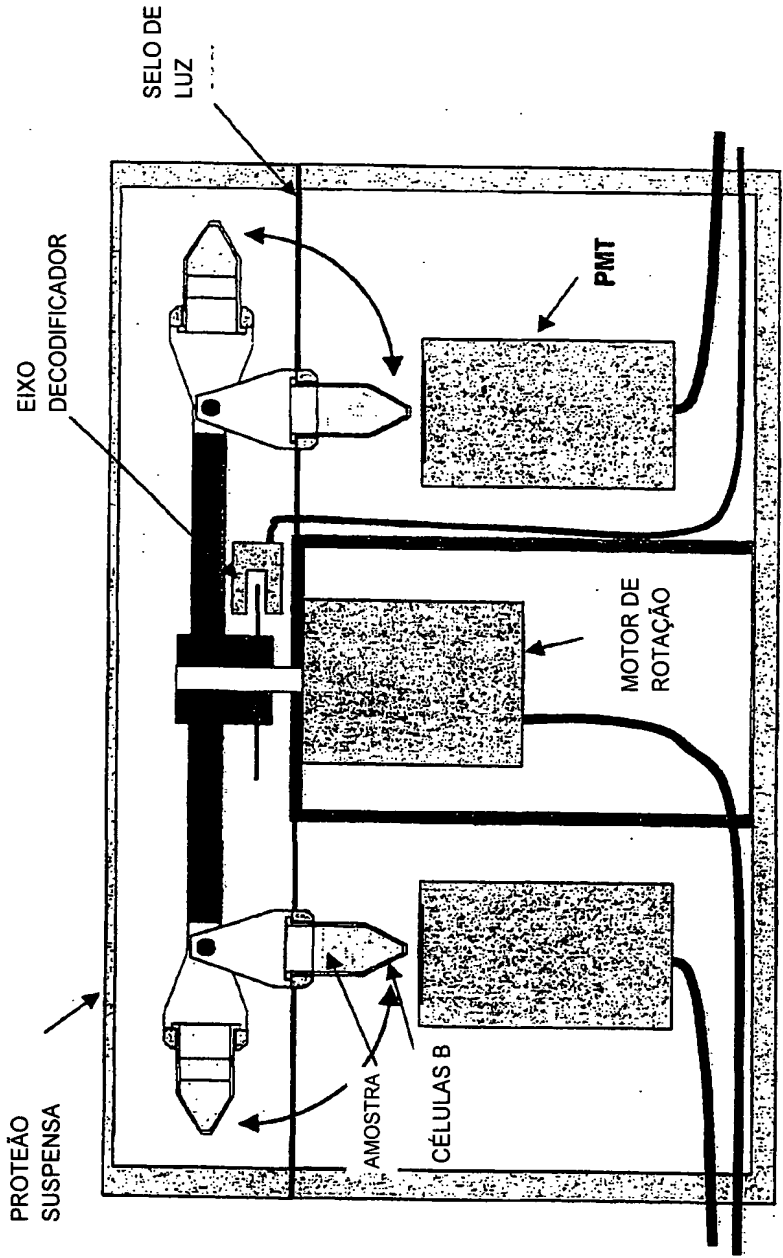


FIG. 17

# CENTRÍFUGA ÚMIDA / CONCEITO DE IMPACTADOR

18/135

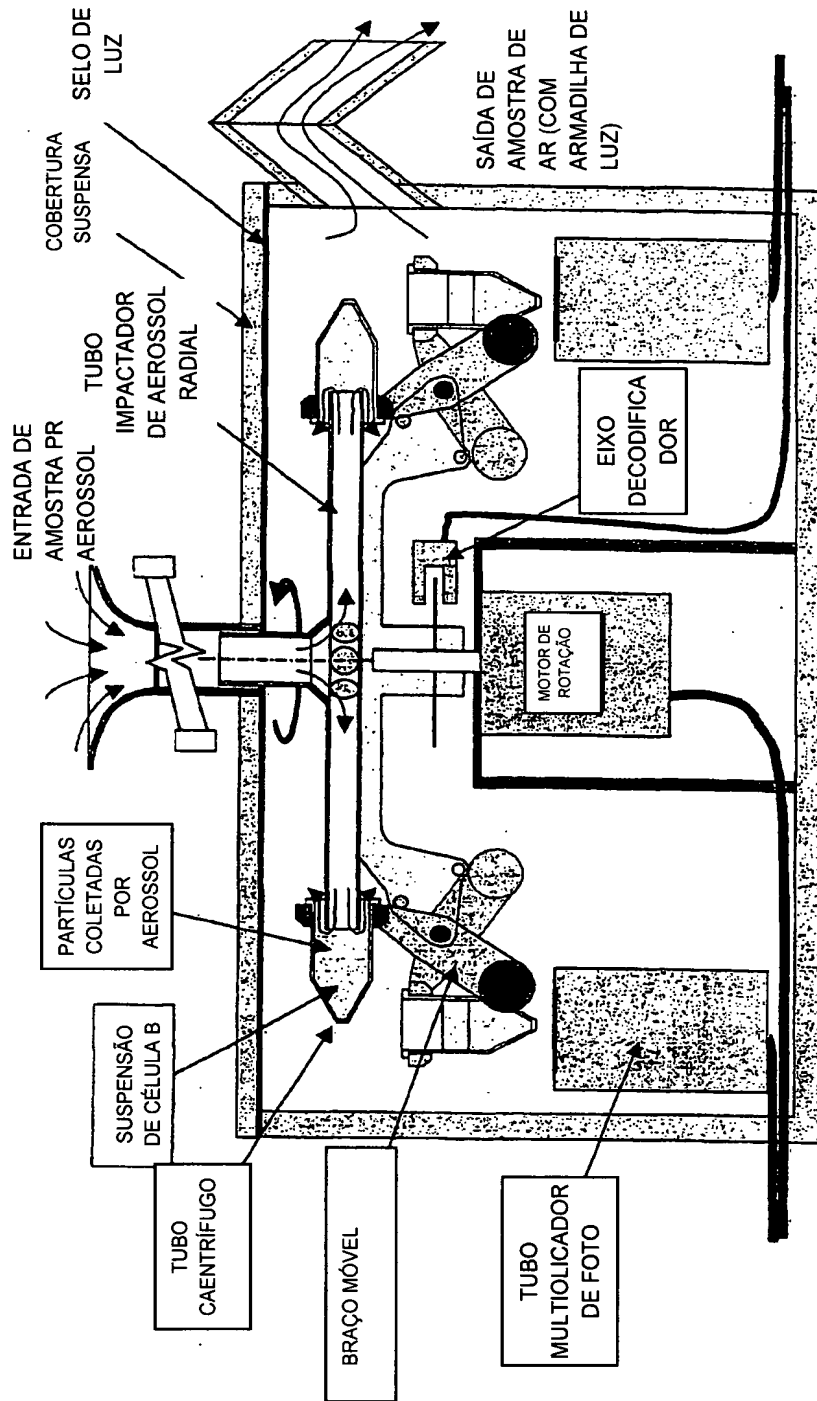


FIG. 18

# CENTRÍFUGA ÚMIDA / CONCEITO DE IMPACTADOR (b)

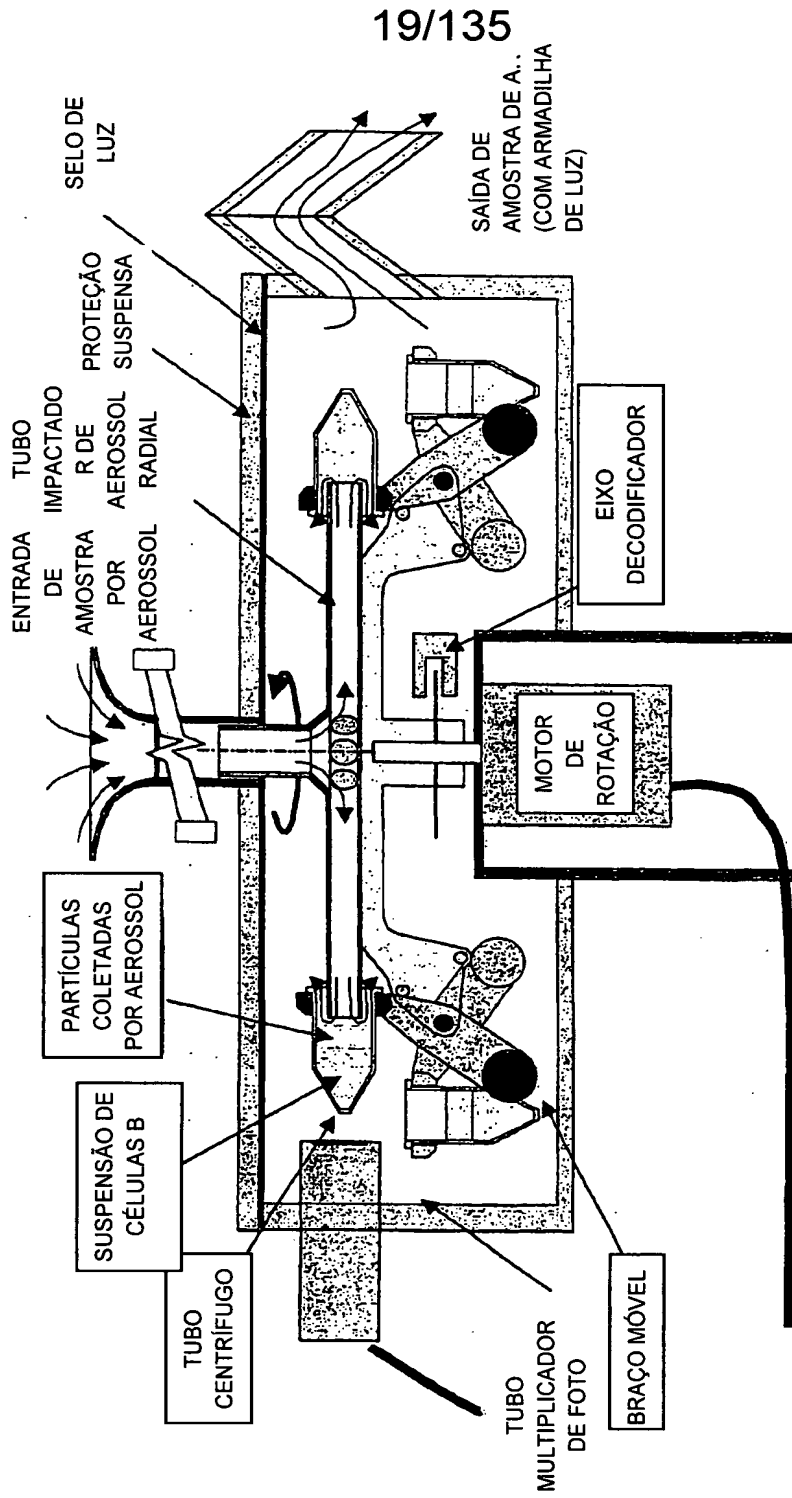
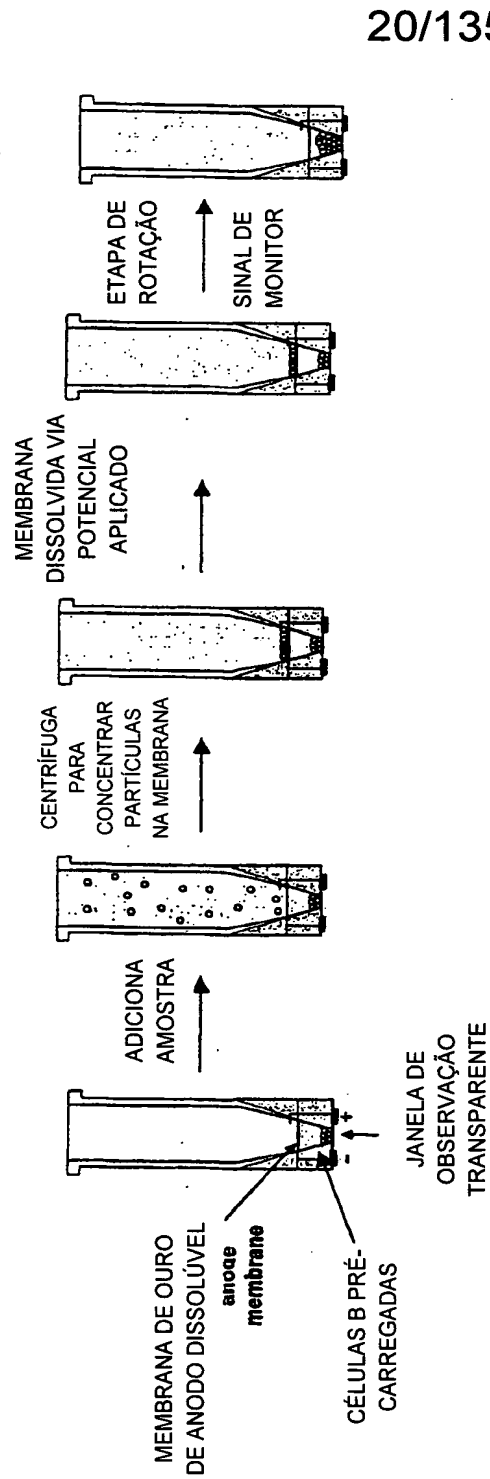


FIG. 19

# CONCEITO DE TUBO CUSTOMIZADO

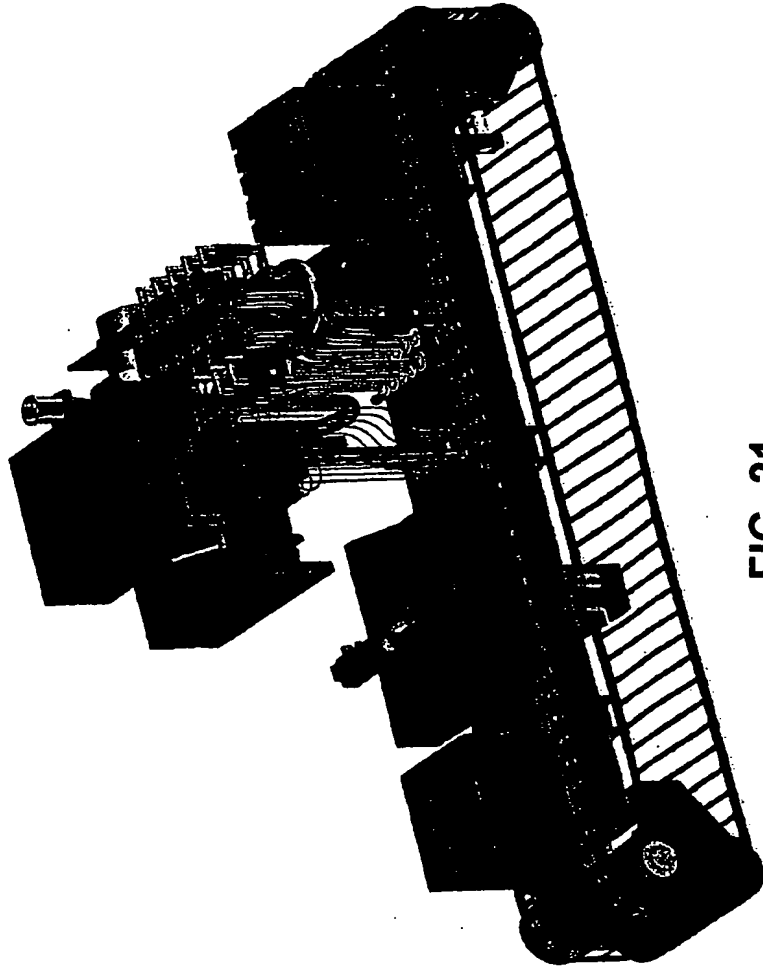


20/135

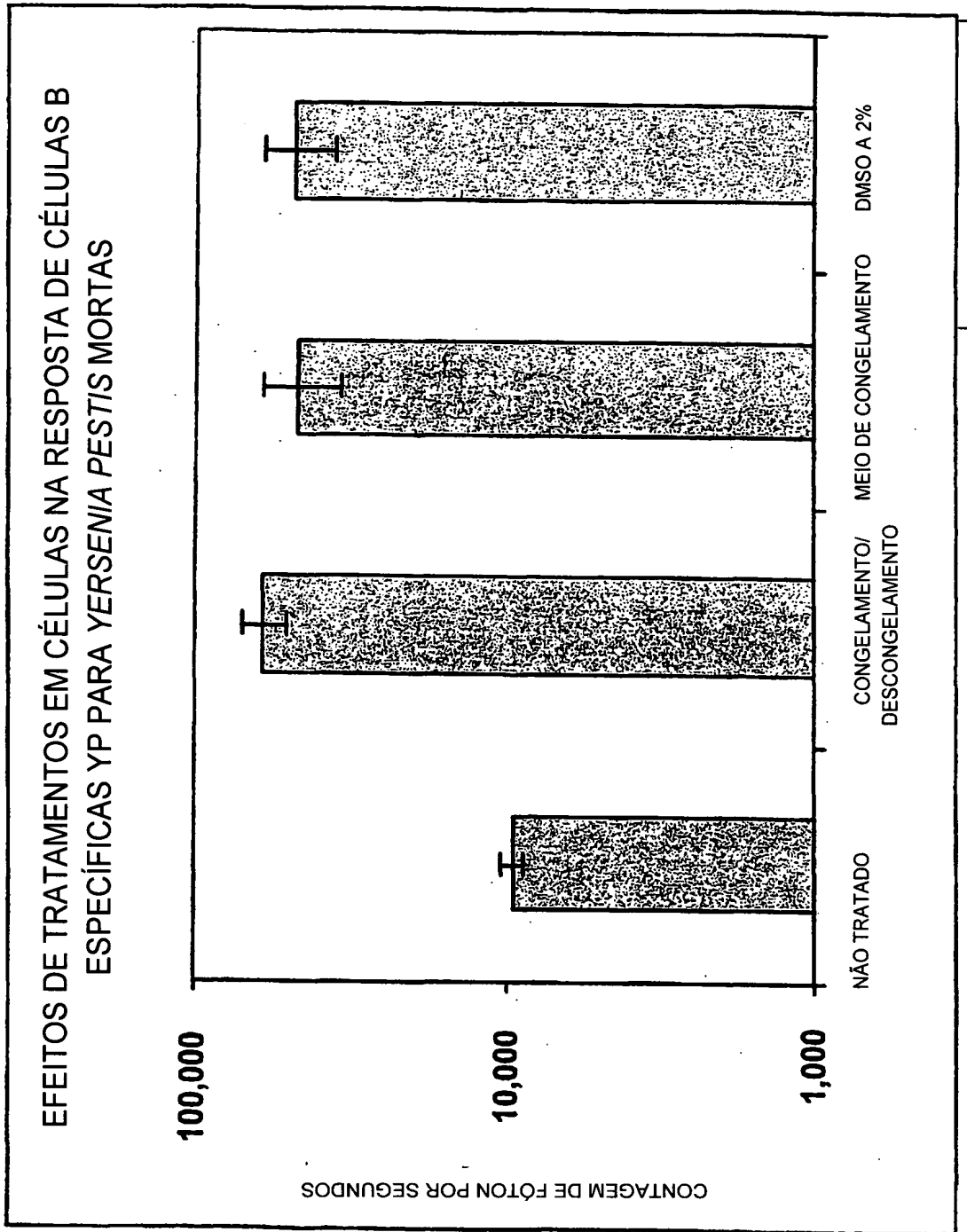
DISSOLUÇÃO DA MEMBRANA DE OURO MOLDADA SEGUNDO APARELHO DE DISTRIBUIÇÃO DE MEDICAMENTOS DE LANGER E ASSOCIADOS: ANGEWANTDE CHIMIE INTERNATIONAL EDITION, VOLUM 39, pg. 2396-2407 (2000) E NATURE VOLUME 398, pg. 335-338 (1999)

FIG. 20

**CONCEITO DE SENSOR / IMPACTADOR A SECO INTEGRADO**



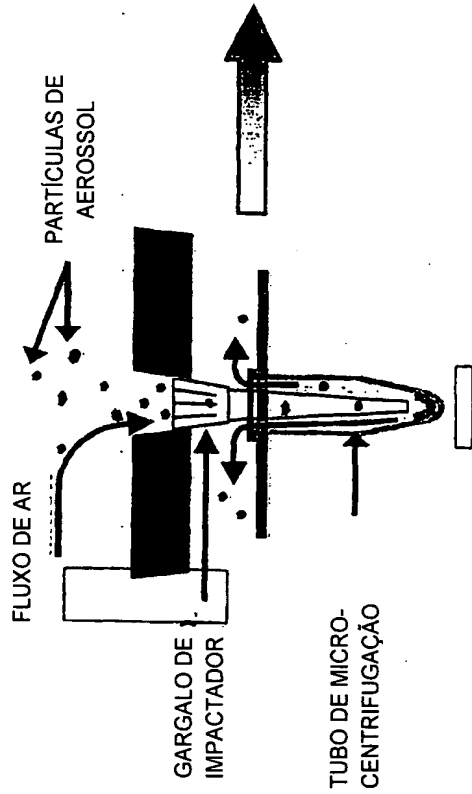
**FIG. 21**



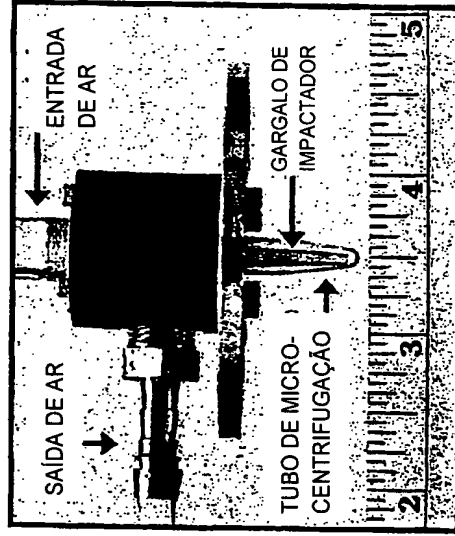
**FIG. 22**

# COLETA VIA AEROSSOL SECO

## CONCEITO



## PROTÓTIPO DE COLETOR SECO



23/135

\* VELOCIDADE DAS PARTÍCULAS FORÇA CONTATO COM SUPERFÍCIE DO TUBO ONDE SÃO FIXADAS

\* ELIMINAÇÃO DO FLUIDO COLETOR SIMPLIFICA O SISTEMA E AUMENTA CONFIABILIDADE

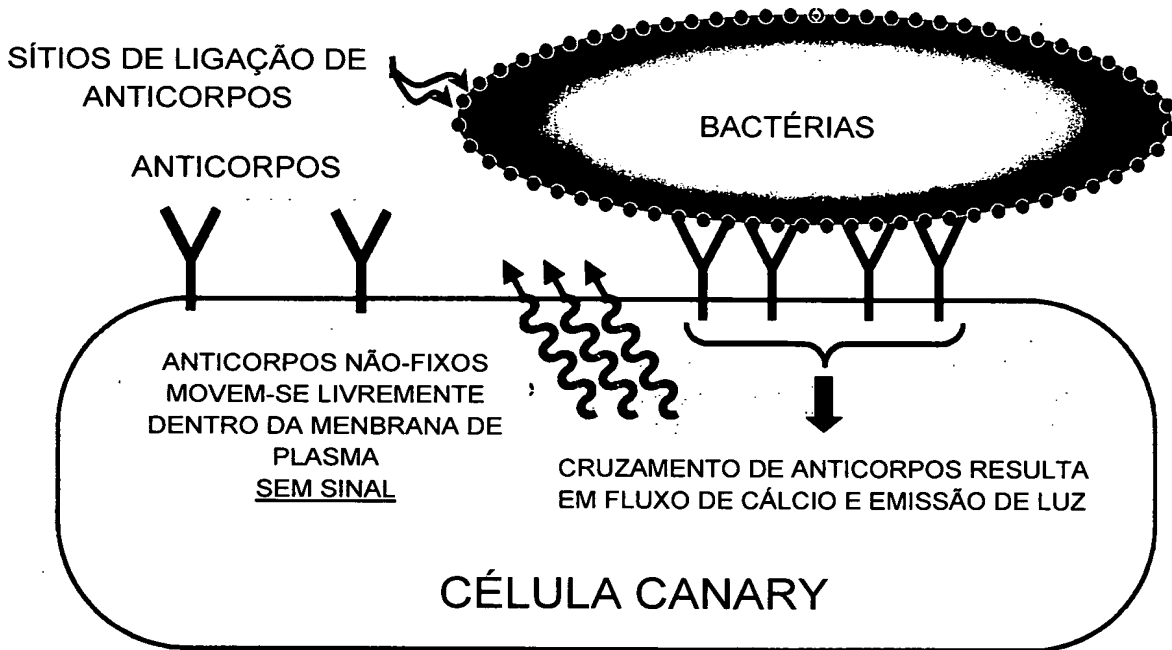
\* PROJETADO PARA TUBOS DE MICRO-CENTRIFUGAÇÃO VISANDO ECONOMIA NA OPERAÇÃO

**FIG. 23**

**FIG. 24**

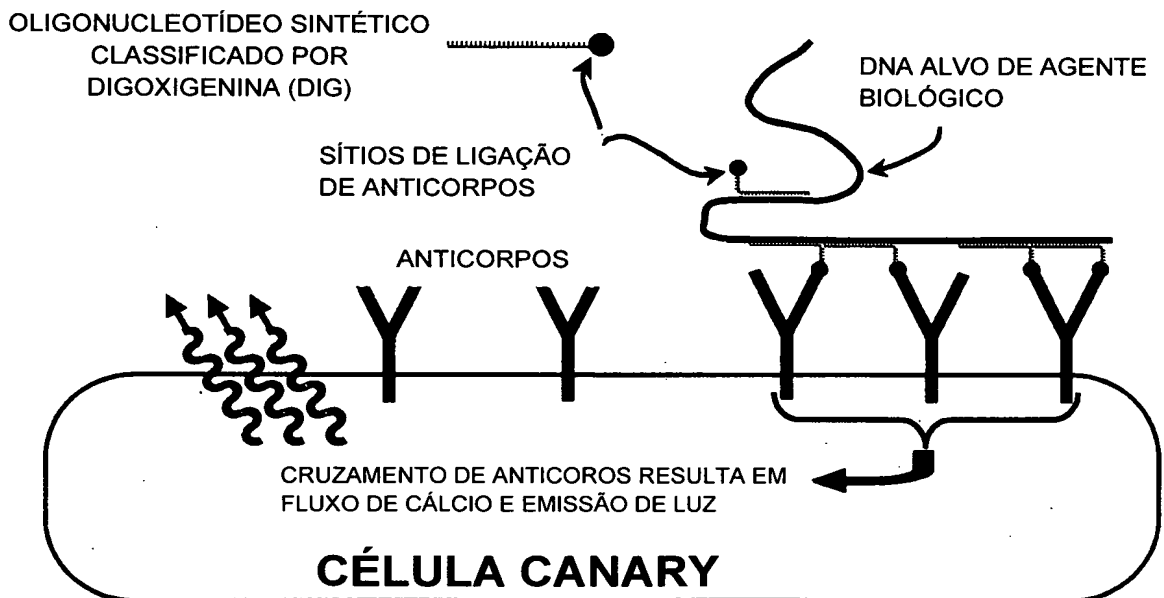
24/135

**FUNDAMENTOS: ESTRATÉGIA DE SENSOR CANARY**



**FIG. 25**

**ESTRATÉGIA: DETECÇÃO DE DAN POR CANARY**

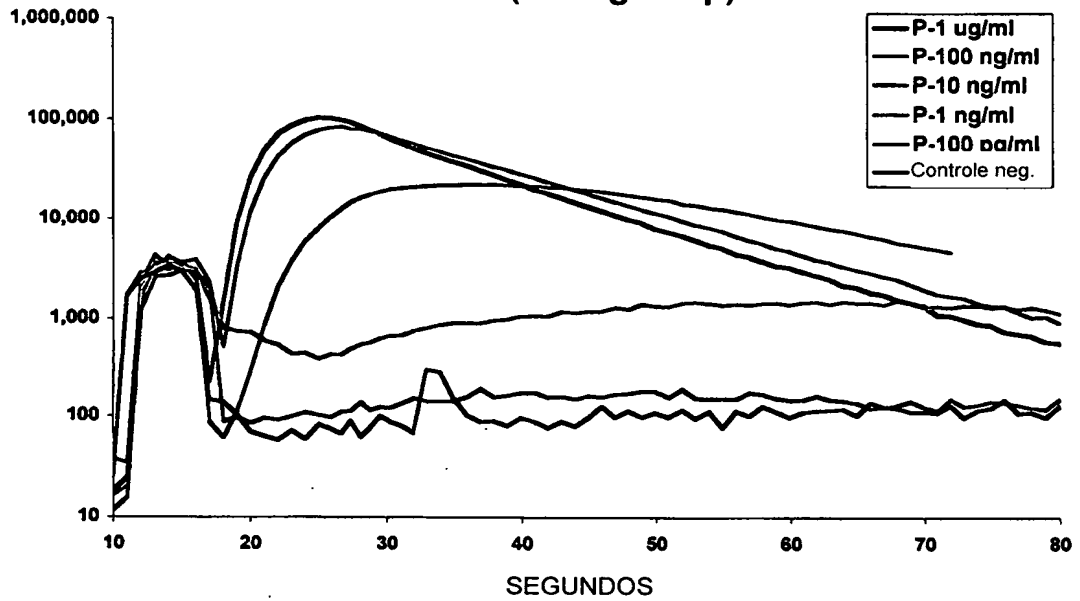


ANTICORPOS DIGOXIGENINA E SEQUÊNCIAS GENTILMENTE CEDIDOS POR DR. GEORGIU, UNIVERSIDADE DE TEXAS EM AUSTIN

**FIG. 26A**

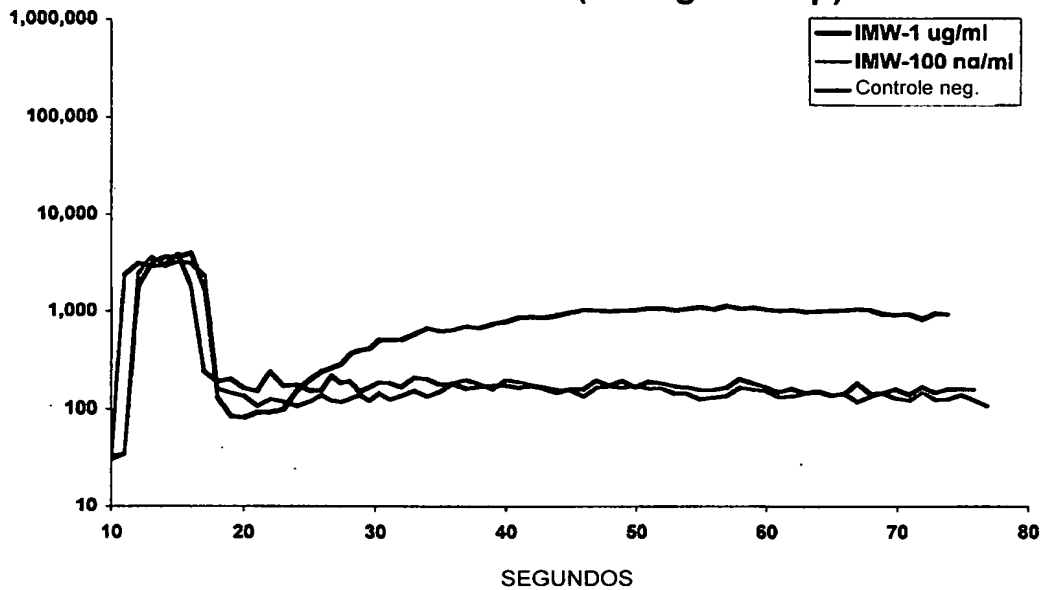
25/135

**DNA PLASMIDIA CLASSIFICADO COM DIGOXIGENINA  
(~1 Dig/20bp)**



**FIG. 26B**

**MARCADORES DE DAN COM PESO MOLECULAR  
CLASSIFICADOS INTERNAMENTE COM DIGOXIGENINA  
(~1 Dig / 200bp)**



26/135

FIG. 26C

MARCADORES DE DAN COM PESO MOLECULAR  
CLASSIFICADOS NA EXTREMIDADE COM DIGOXIGENINA

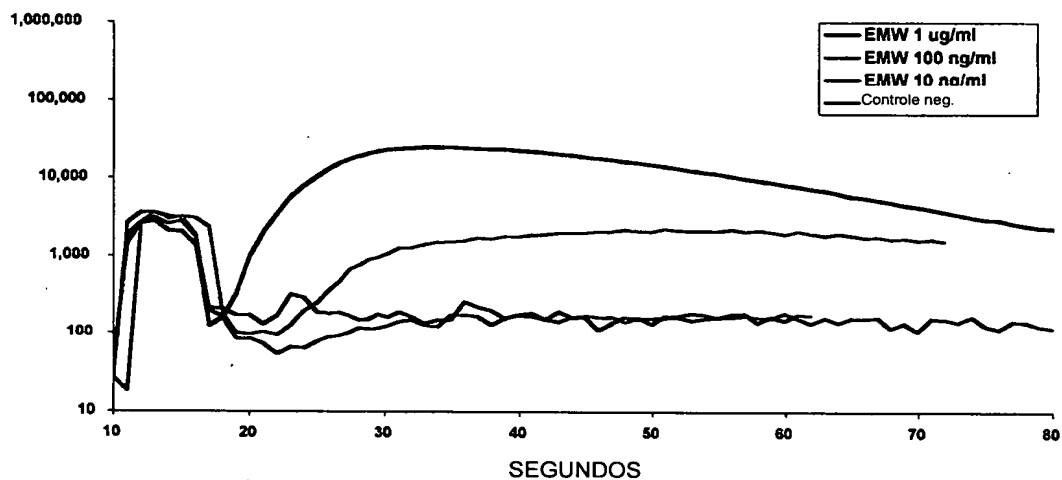


FIG. 27A

CÉLULAS DE MEDIÇÃO DE DNA DIG-PLASMIDIA CENTRIFUGADAS ANTES DA  
MEDIÇÃO POR FÓTON

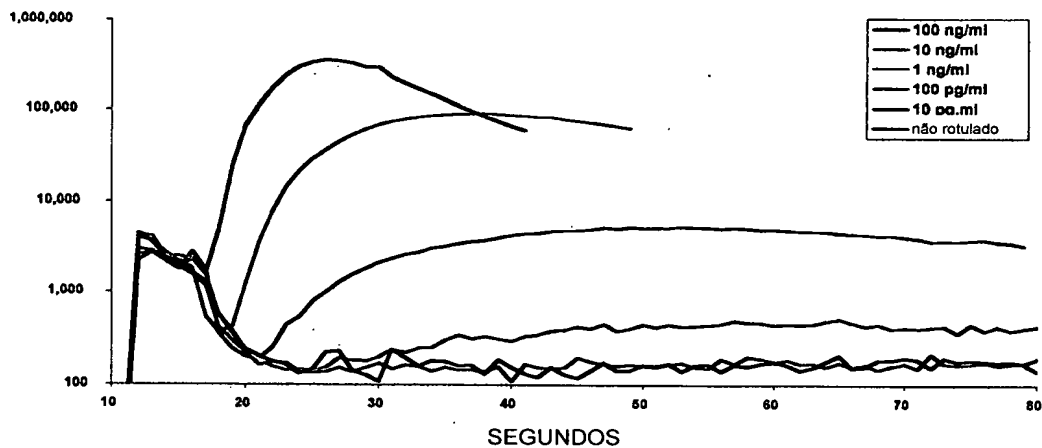


FIG. 27B

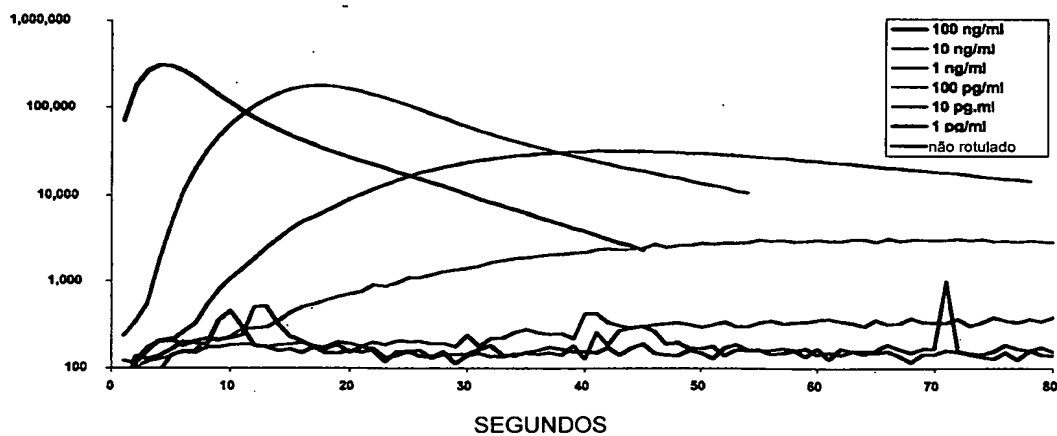


FIG. 28

HIBRIDIZAÇÃO DE 2 OLIGOS CLASSIFICADOS POR DIG

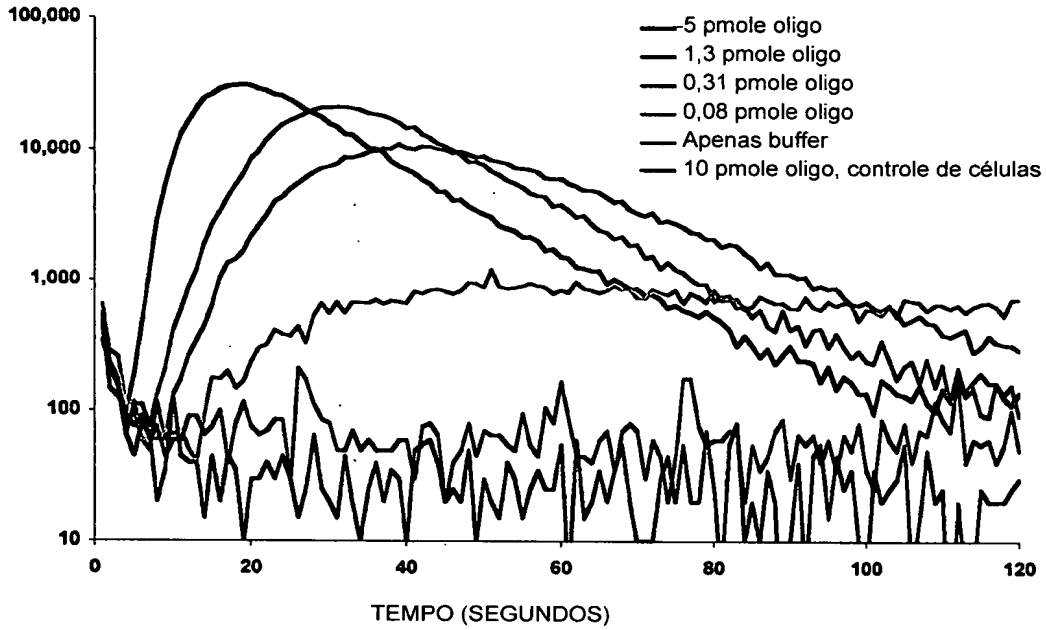


FIG. 29

DETECÇÃO DE OLIGOS COMPLEMENTARES: TEMPO DE HIBRIDIZAÇÃO MUITO CURTO

hybridization time

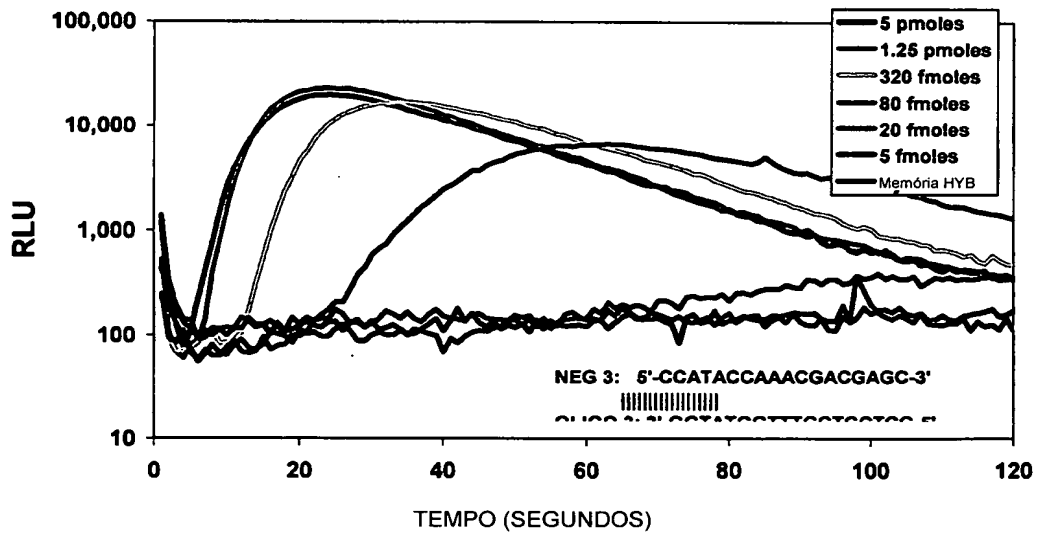


FIG. 30

28/135

DETECÇÃO DE 5ug ssDNA (5 moles)

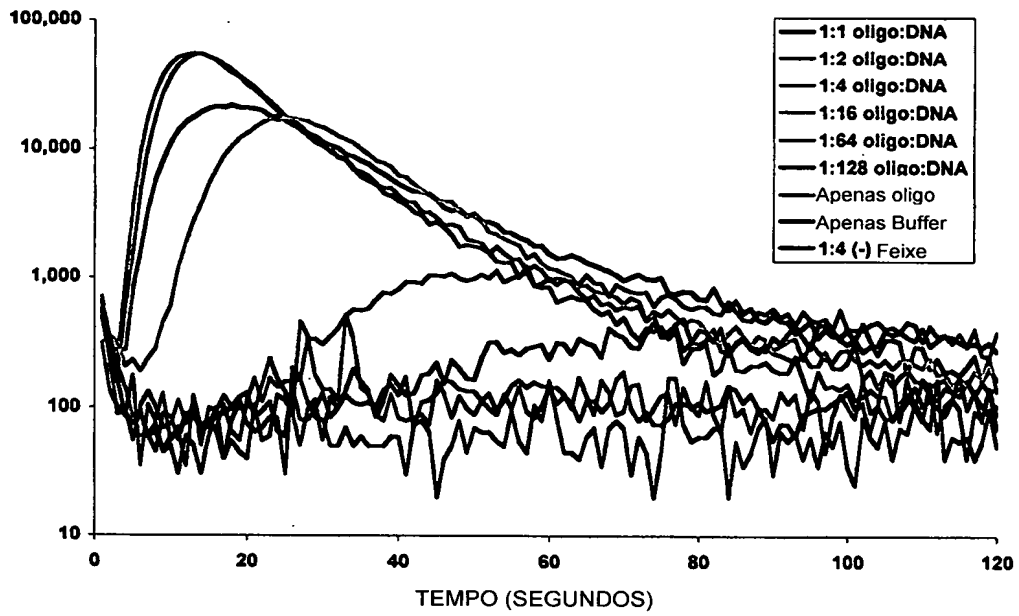


FIG. 31

DETECÇÃO DE ssDNA

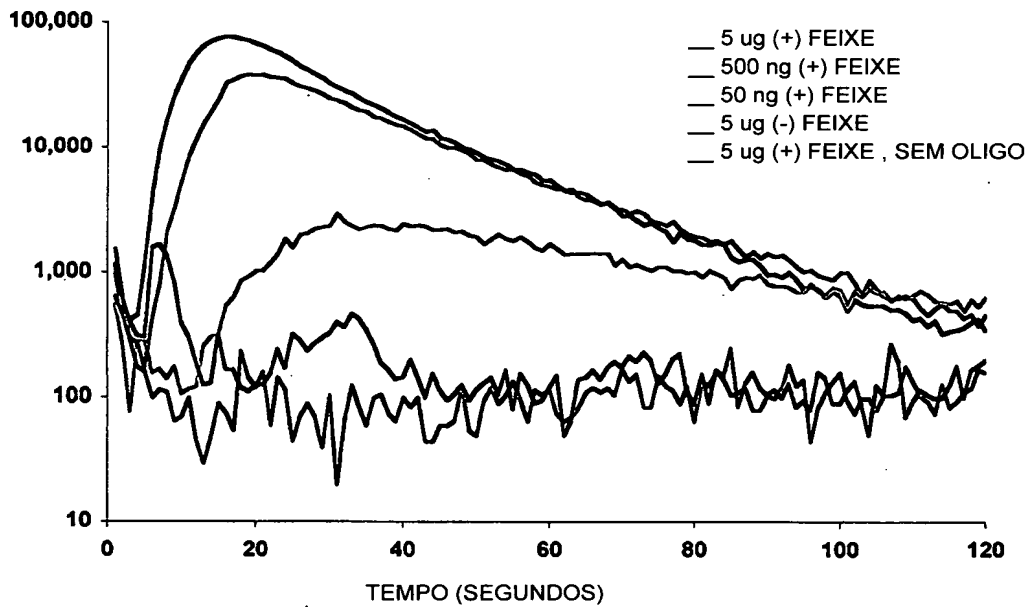


FIG. 32A

29/135

### EFEITOS DA TEMPERATURA DE HIBRIDIZAÇÃO NA DETECÇÃO DE ssDNA EM PBS

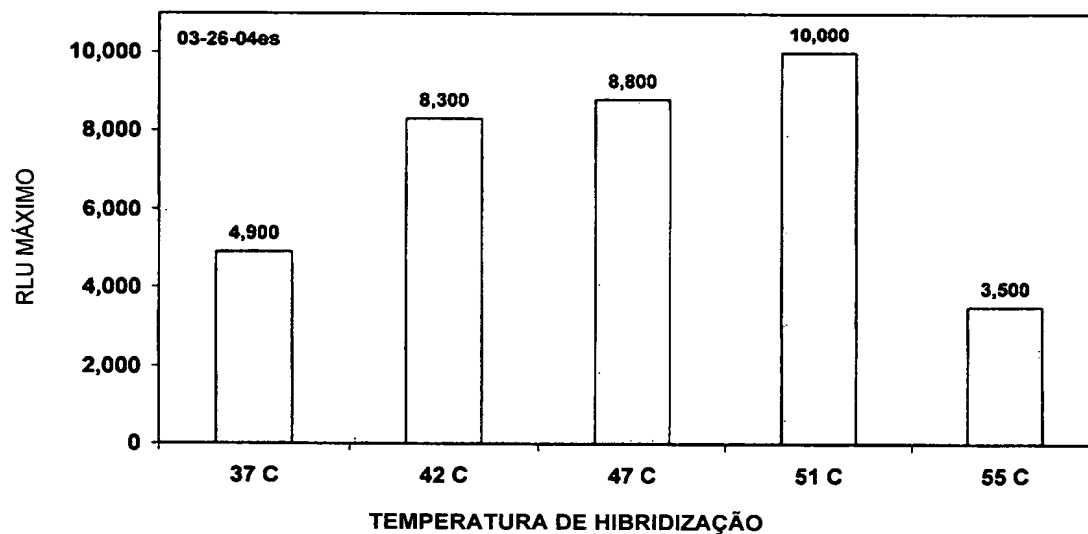


FIG. 32B

### EFEITOS DA TEMPERATURA DE HIBRIDIZAÇÃO NA DETECÇÃO DE ssDNA EM NaCl/TRIS

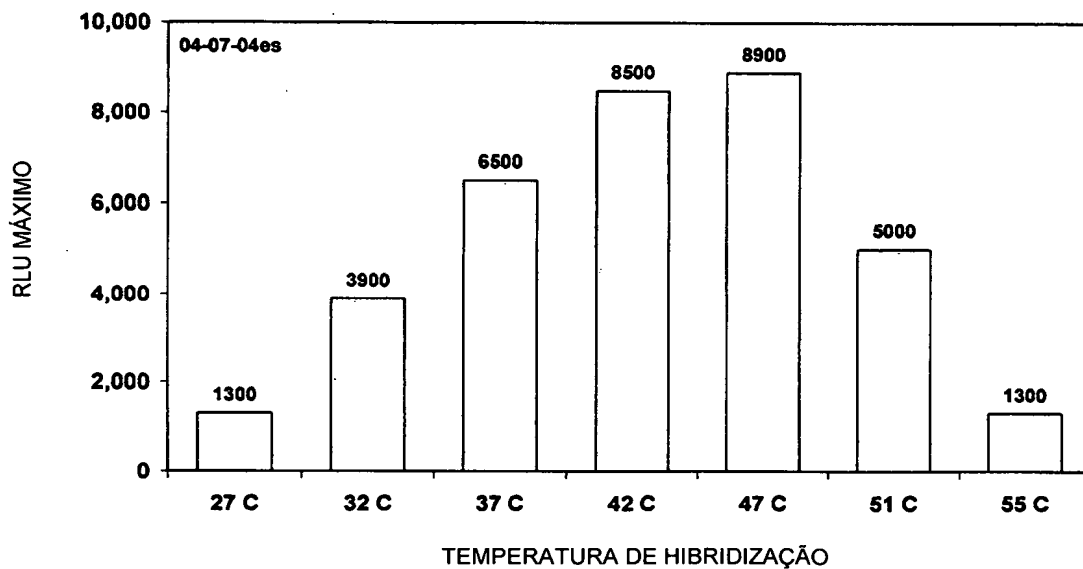


FIG. 33

30/135

### ESTRATÉGIA PARA SEDIMENTAÇÃO DE DNA

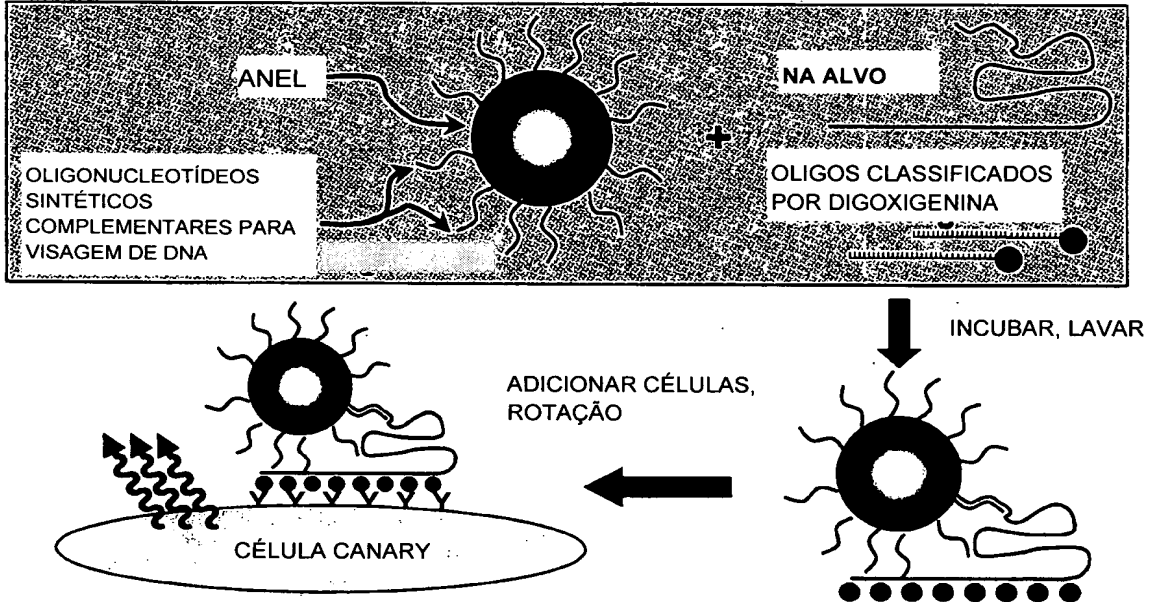
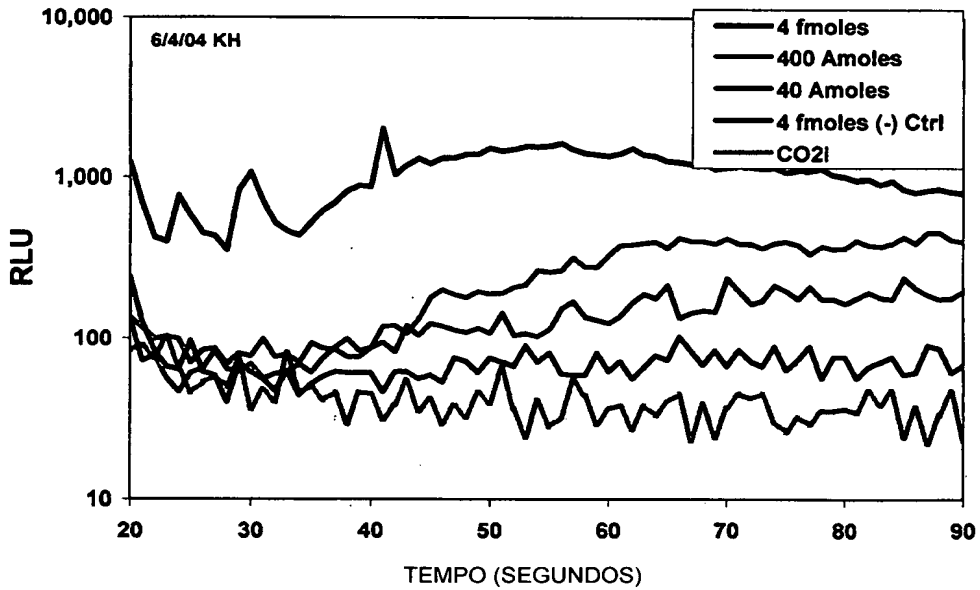


FIG. 34

### RESPOSTA POR DOSAGEM AO ssDNA DIRIGIDO AO NÚCLEO



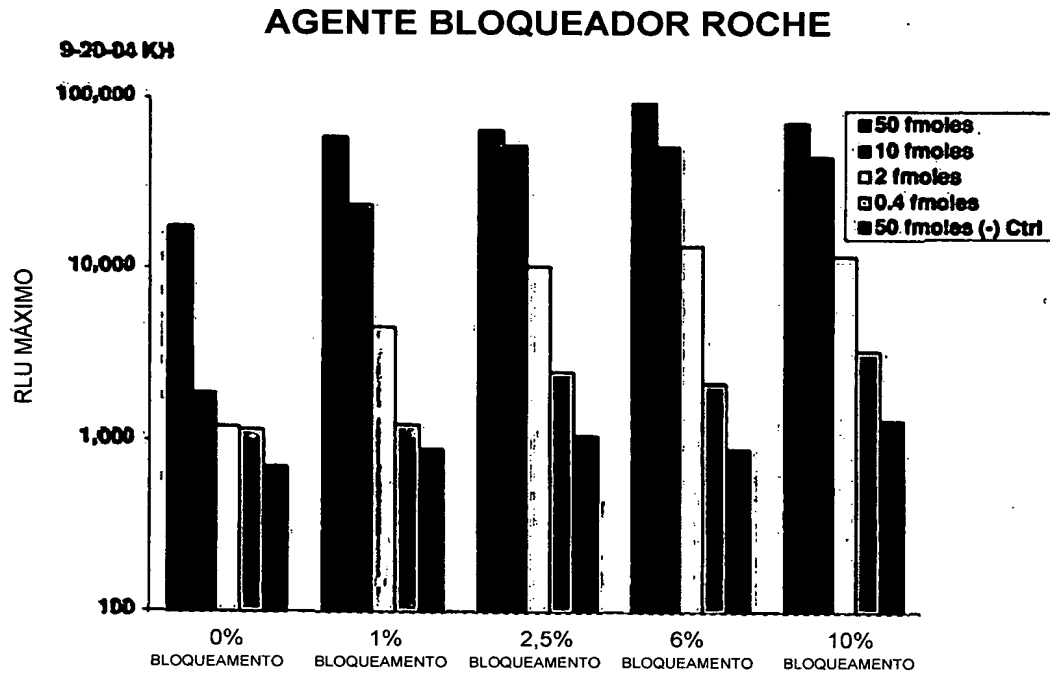
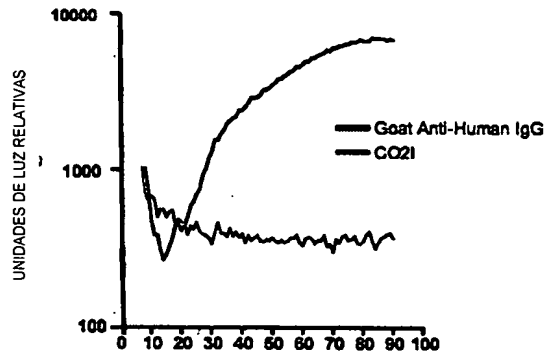
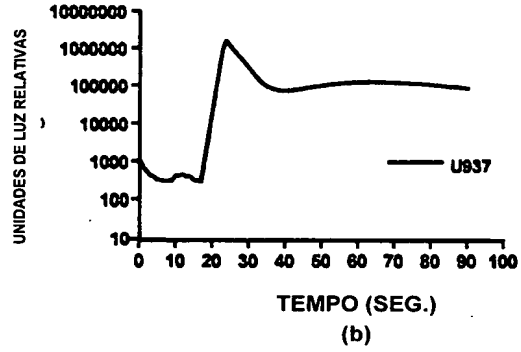
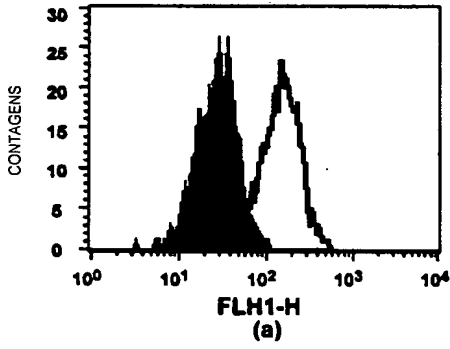
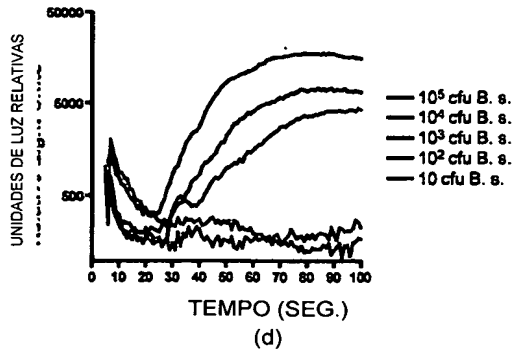
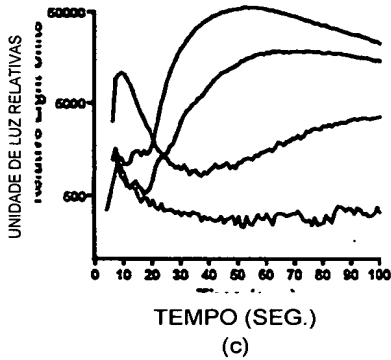
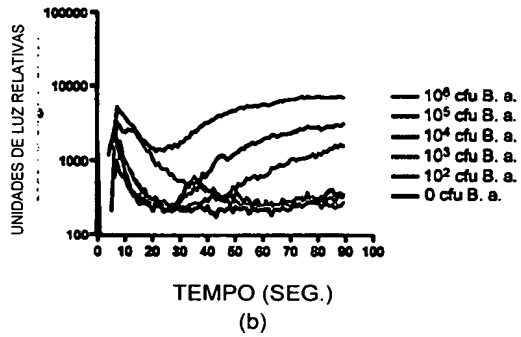
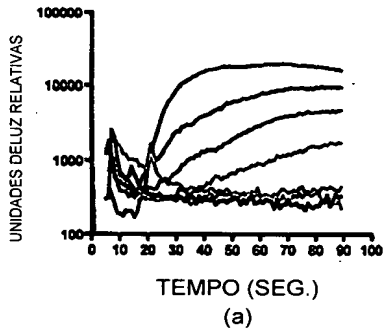


FIG. 35

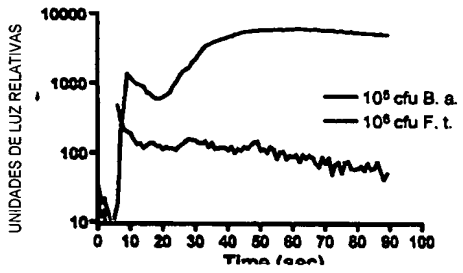
32/135



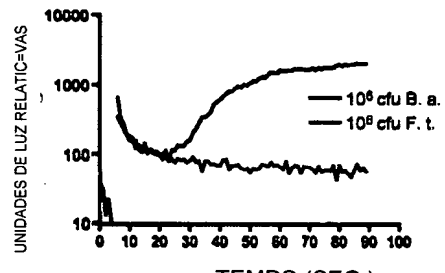
FIGS. 36A-C



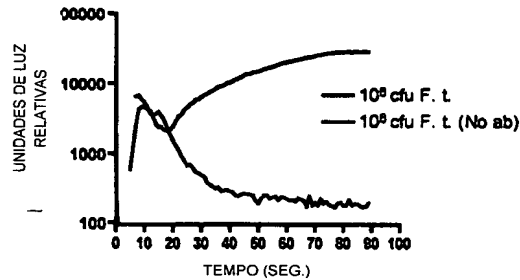
FIGS. 37A-D



(a)



(b)



(c)

FIGS. 38A-C

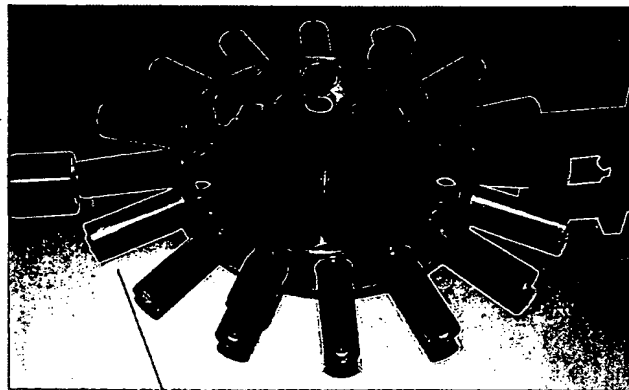


FIG. 39

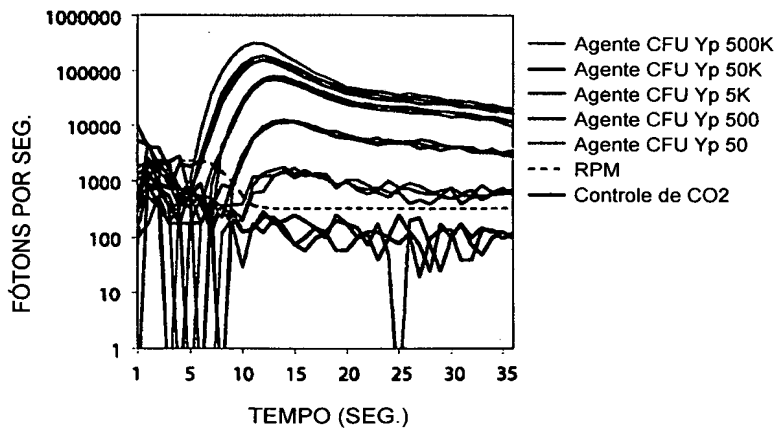


FIG. 40

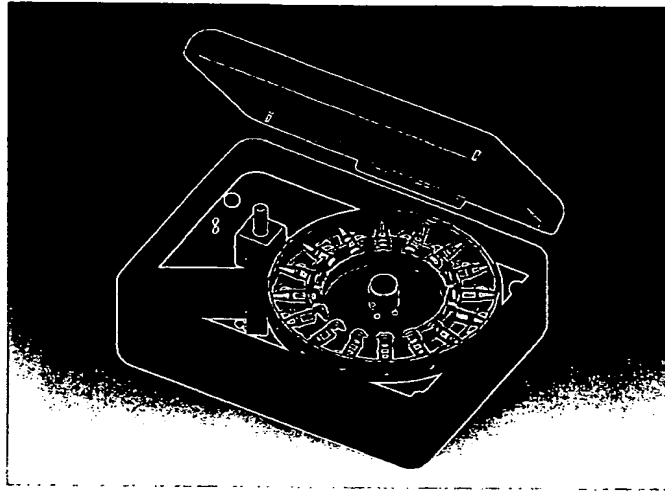


FIG. 41

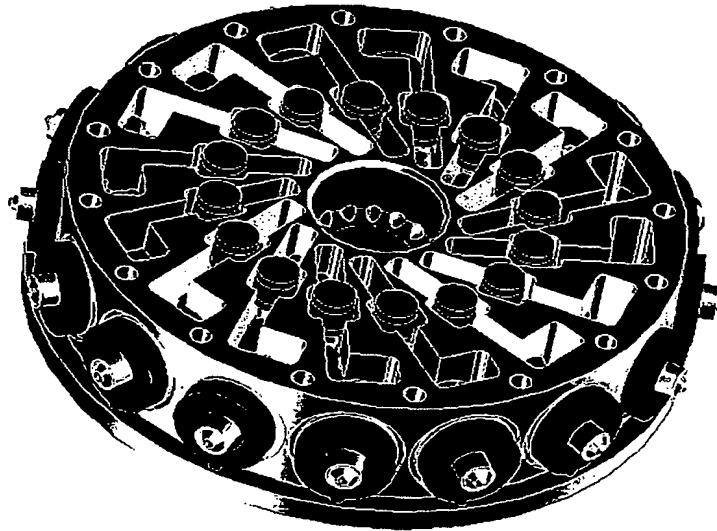


FIG. 42

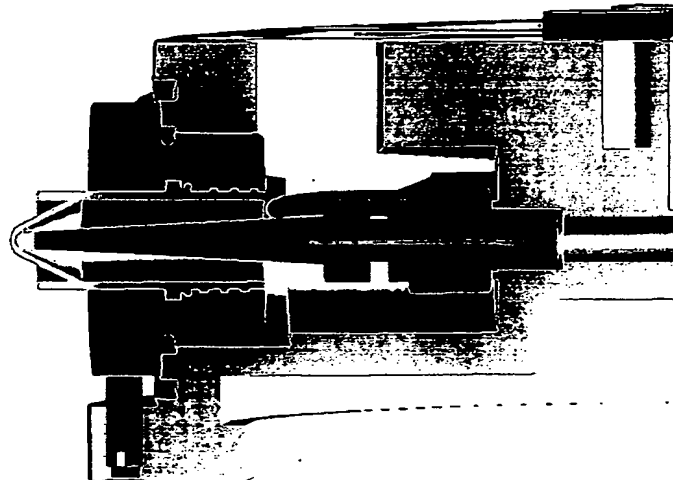


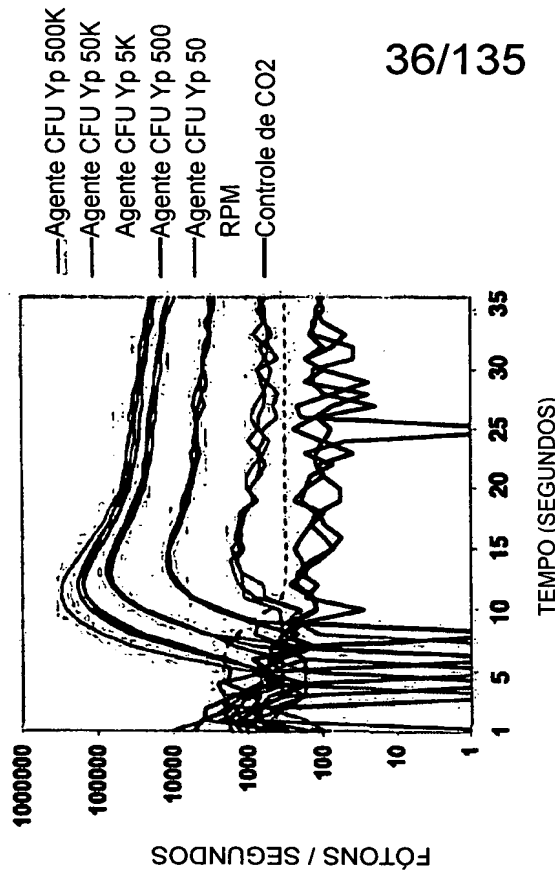
FIG. 43

35/135



**FIG. 44**

MEDIÇÃO SIMULTÂNEA DE 16 AMOSTRAS EM PROTÓTIPO DE SENSOR DE 16 CANAIS



\* ENSAIO MODIFICADO DETECTA SIMULAÇÃO DE TOXINA MONOMÉTRICA

\* ILUSTRAÇÃO DE ENGENHARIA DE CÉLULAS UNIVERSAIS EM 10 MINUTOS vs. 2 - 3 MESES

\* ILUSTRAÇÃO DE PROTÓTIPO DE SENSOR DE 16 CANAIS

— LEITURA SIMULTÂNEA DE 16 AMOSTRAS CARREGADAS MANUALMENTE USANDO PMT ÚNICO

— SENSIBILIDADE IDÊNTICA AO SENSOR DE CANAL ÚNICO

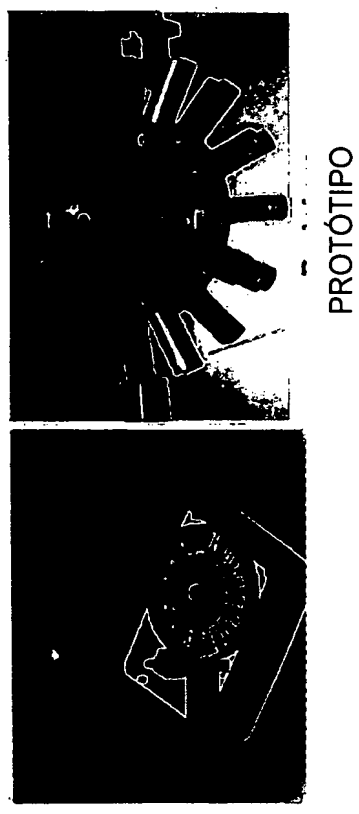


FIG. 45

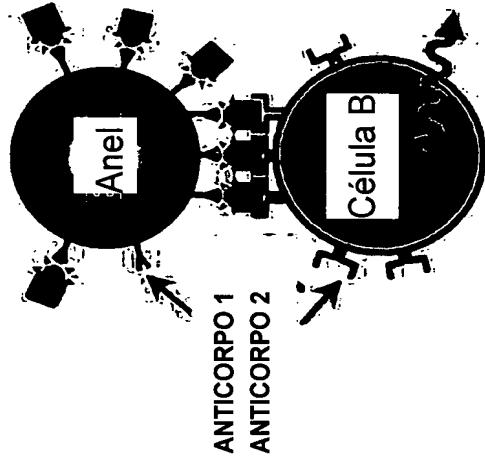
# DETECÇÃO CANARY DE SIMULAÇÕES DE TOXINAS

\* MODIFICAÇÃO DE ENSAIO CANARY PARA DETECTAR PROTEÍNAS SOLÚVEIS MONOMÉTRICAS

--- VELOCIDADE: ATUALMENTE  $\geq$  A 15 MINUTOS

--- SENSIBILIDADE: ATUALMENTE 6ng (0.01 X LD50)

\* MODIFICAÇÕES NO ENSAIO EM DESENVOLVIMENTO PARA OTIMIZAR VELOCIDADE E SENSIBILIDADE



\* CADEIA PESADA DE TOXINA DE BOTULINUM

37/135

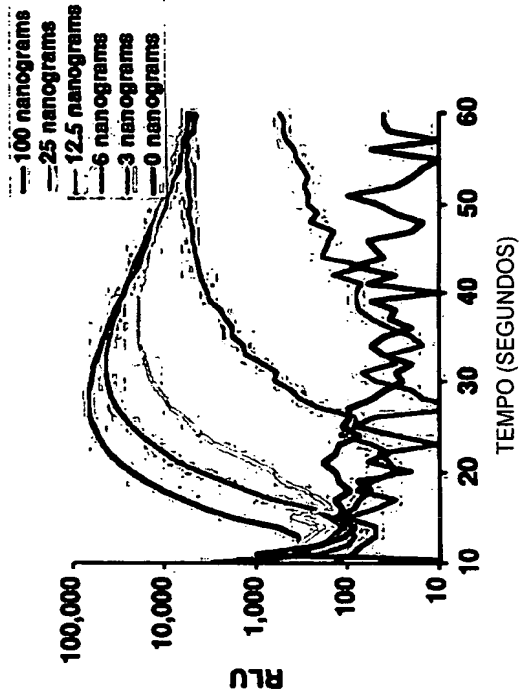
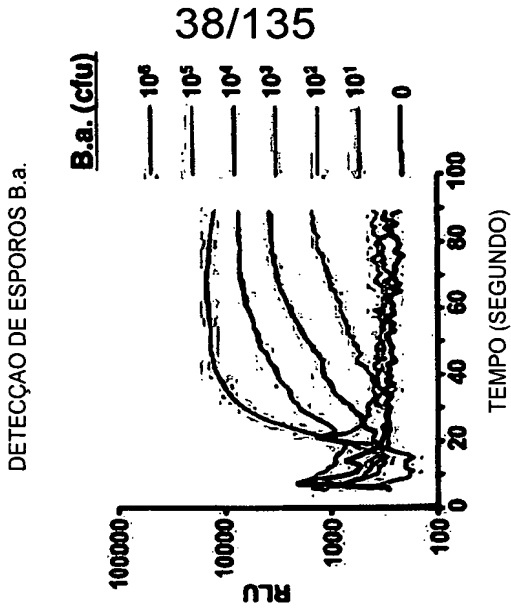
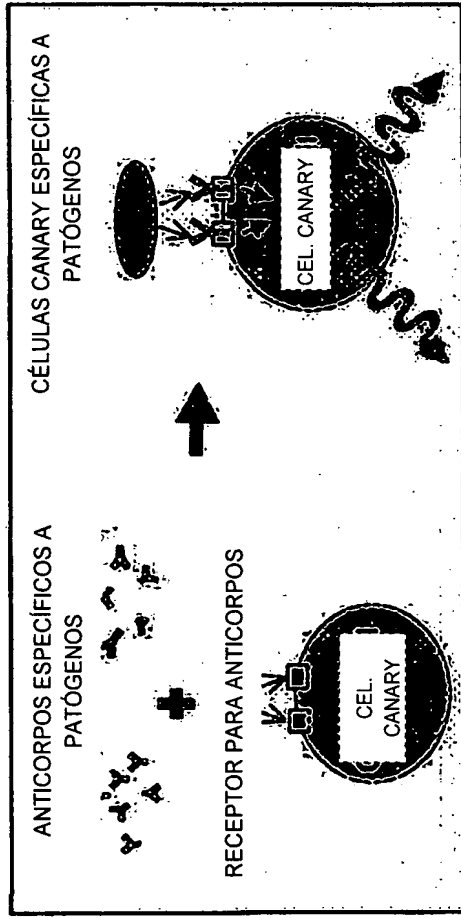


FIG. 46

# CÉLULAS CANARY UNIVERSAL

META: ARQUITETAR UMA LINHA DE CÉLULA UNIVERSAL QUE POSSA SER USADA PARA GERAR NOVAS CÉLULAS ESPECÍFICAS A PATÓGENOS EM MENOS DE 1 DIA (vs. 2 A 3 MESES)

ABORDAGEM:  
CRIAR UMA LINHA DE CÉLULA QUE EXPRESSA AEQUORINA E UM RECEPTOR DE ANTICORPO GENERALIZADO



## ACOMPANHAMENTO:

- \* GERAÇÃO RÁPIDA (< 10 MIN.) DE CÉLULAS ESPECÍFICAS A PATÓGENOS
- \* FLEXÍVEL:PODE ACEITAR ANTICORPOS MONOCLONAIS E POLICLONAIS
- \* DETECÇÃO ESPECÍFICA: PESQUISANDO PARA OTIMIZAR SENSIBILIDADE

FIG. 47

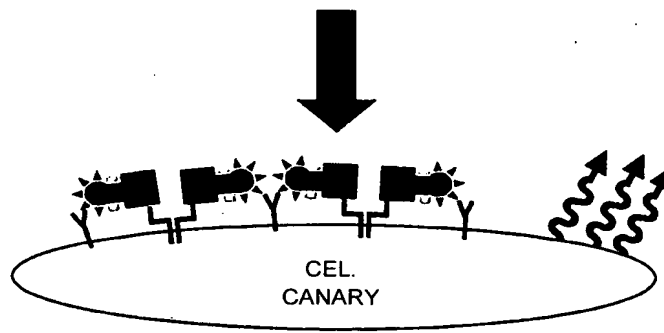
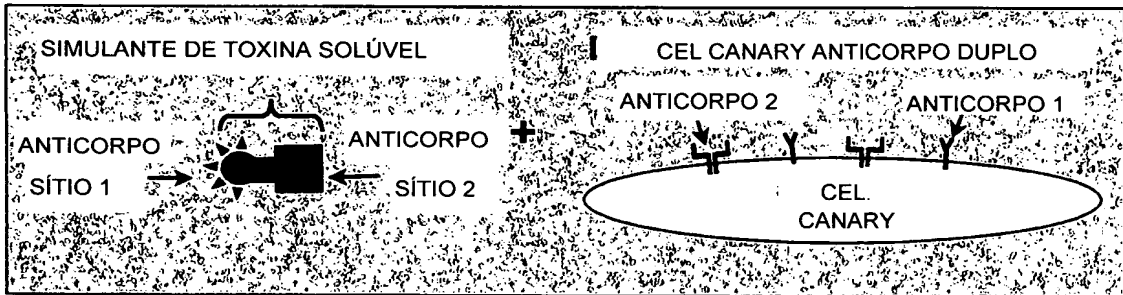


FIG. 48

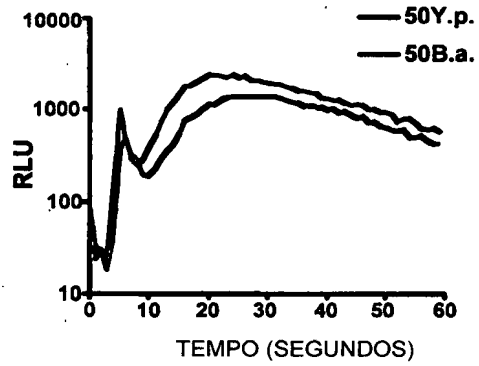


FIG. 49

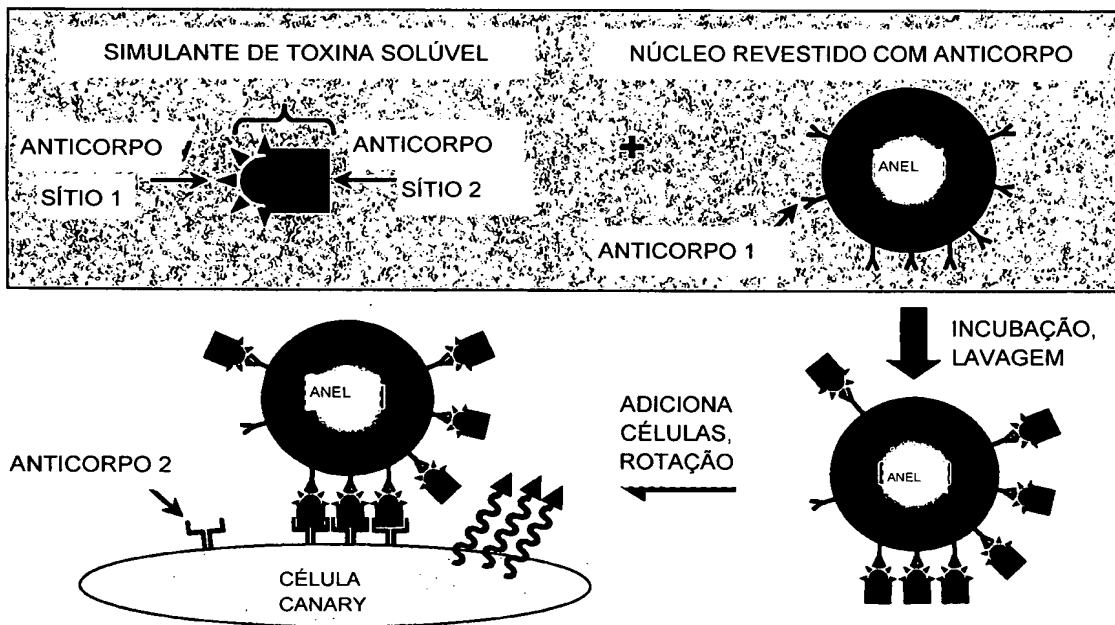


FIG. 50

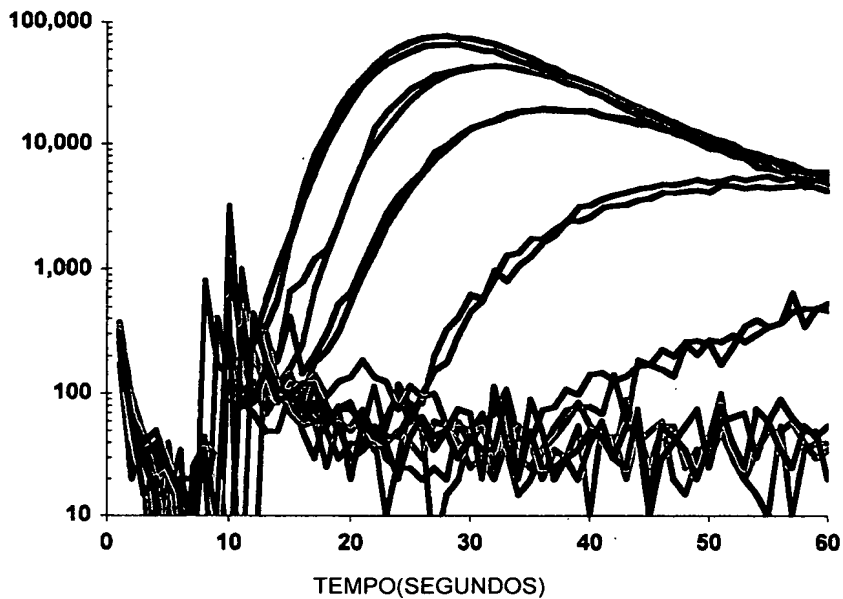


FIG. 51

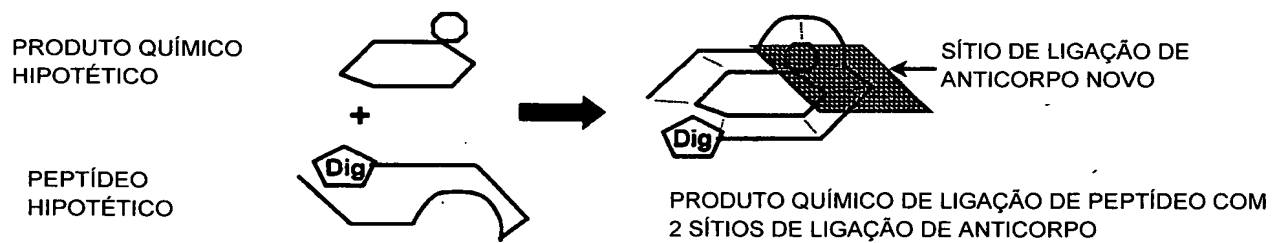


FIG. 52

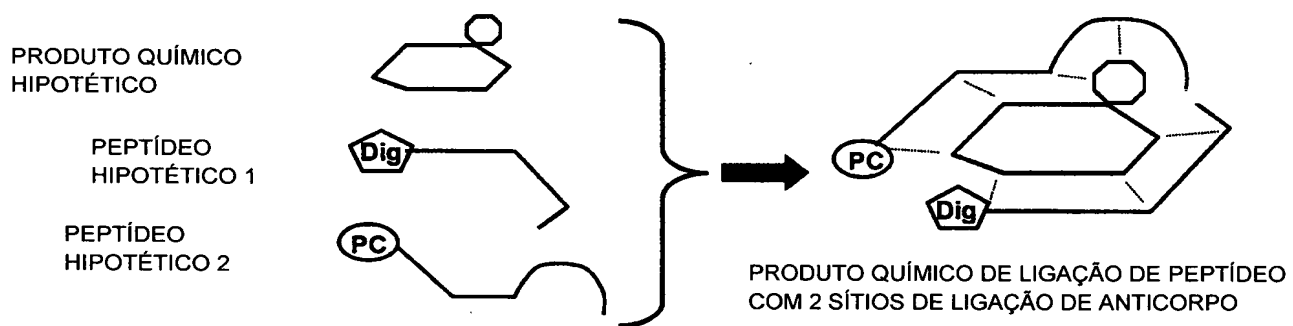


FIG. 53

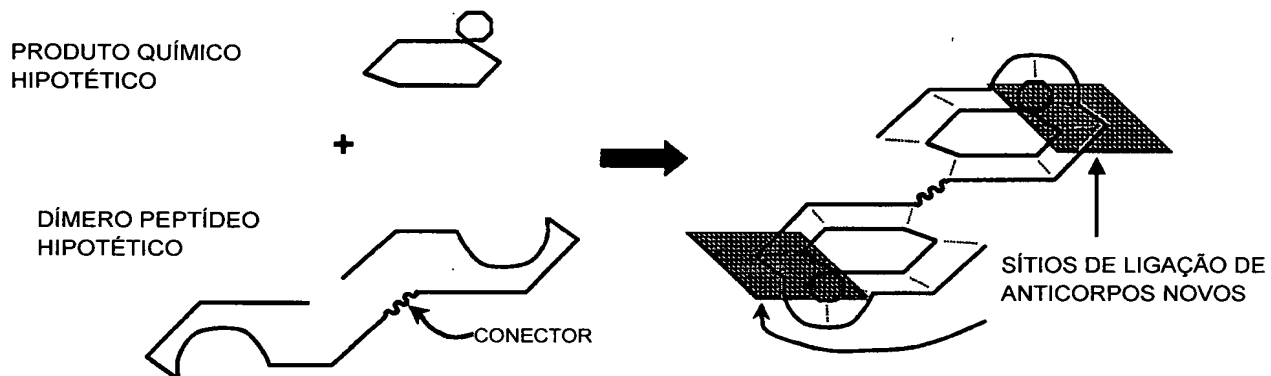


FIG. 54

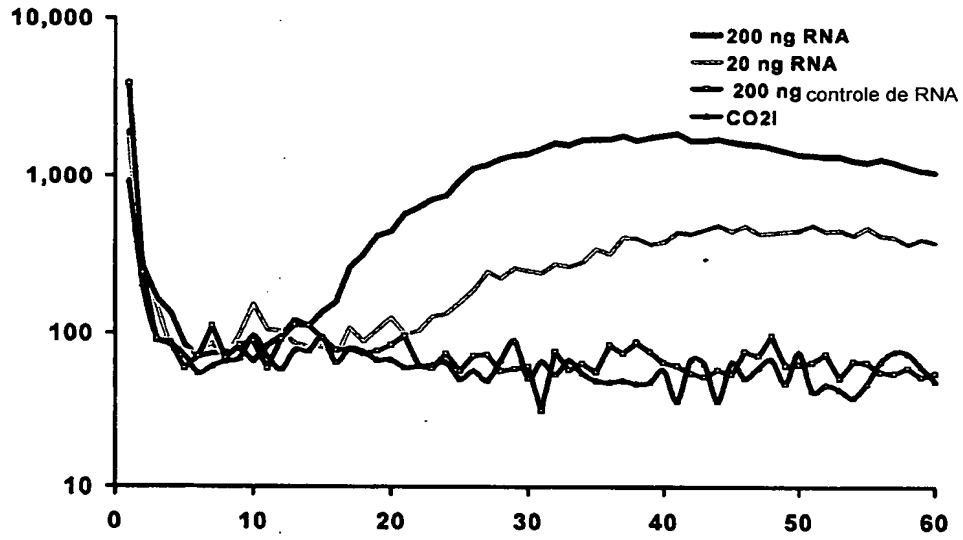


FIG. 55

O DESAFIO DE DETECÇÃO DE PROTEINAS SOLÚVEIS  
(EX. TOXINAS)

TOXINAS DE PROTEINAS PODEM SER MONOMÉTRICAS, O  
QUE DEIXARIA DE ESTIMULAR CÉLULAS CANARY

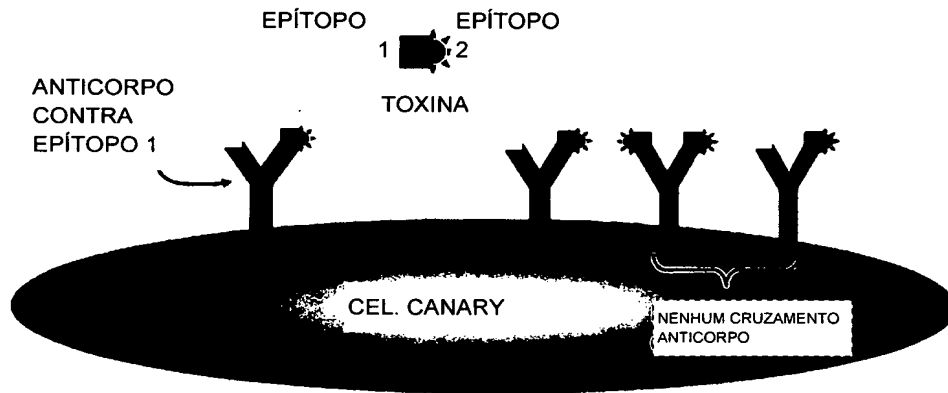
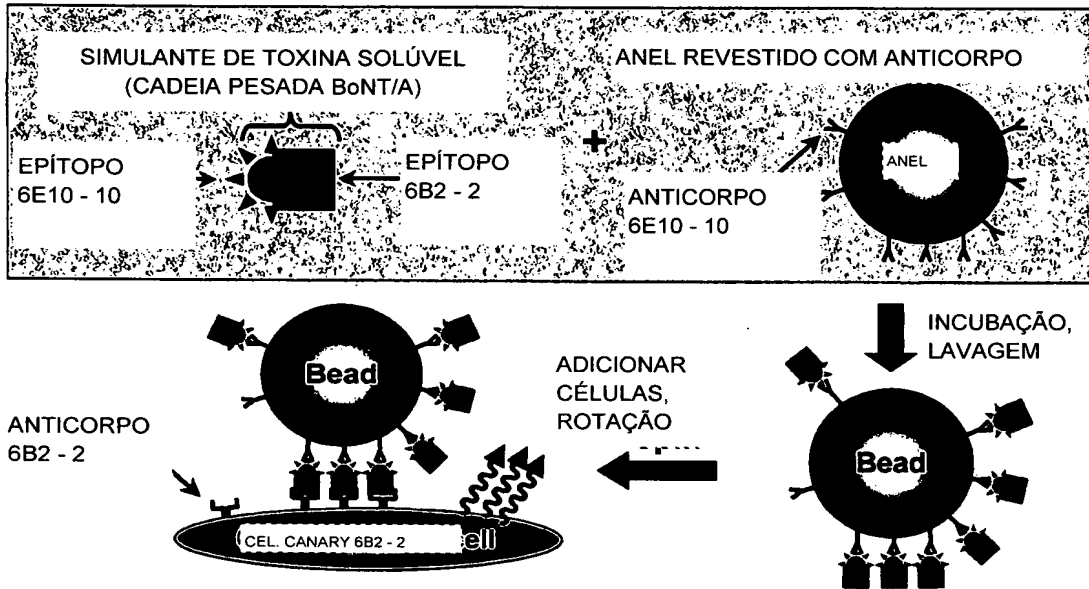


FIG. 56

DETECÇÃO DE ANTÍGENO SOLÚVEL, MONOMÉRICO  
POR CANARY



ANTICORPOS BoNT CEDIDOS POR S. BAVARI E G. LUDWIG, USAMRIID

FIG. 57

DETECÇÃO DE BoNT/A Hc POR CANARY

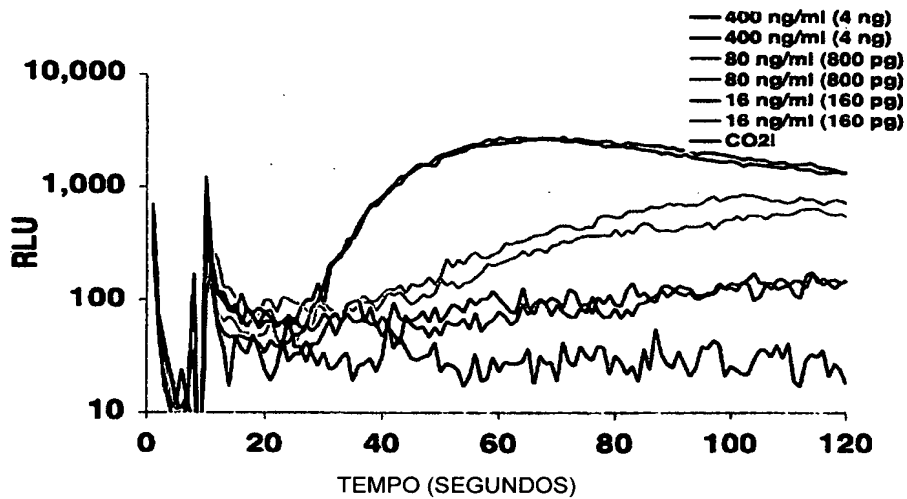


FIG. 58

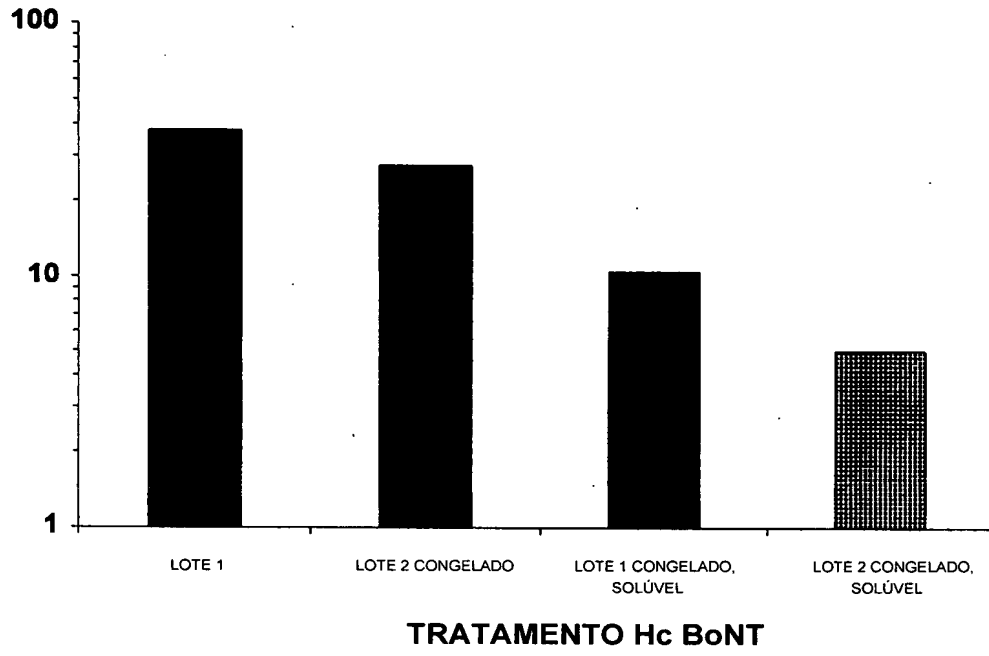


FIG. 59

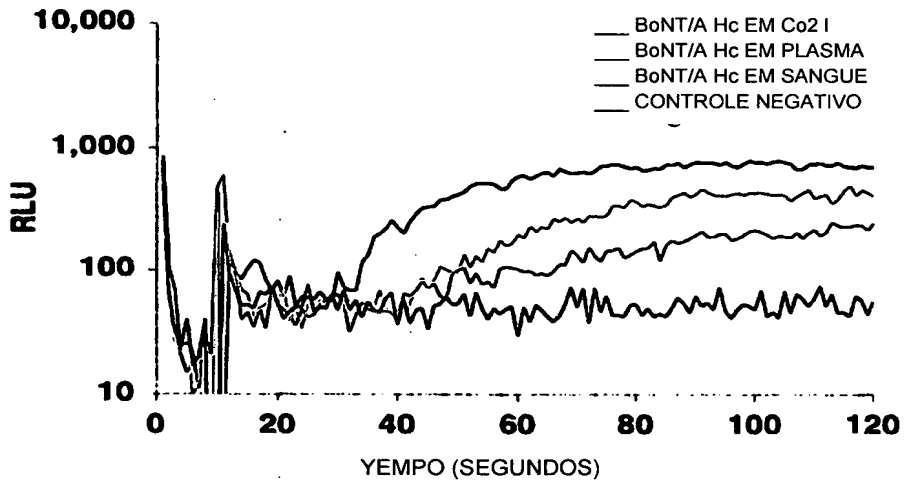


FIG. 60

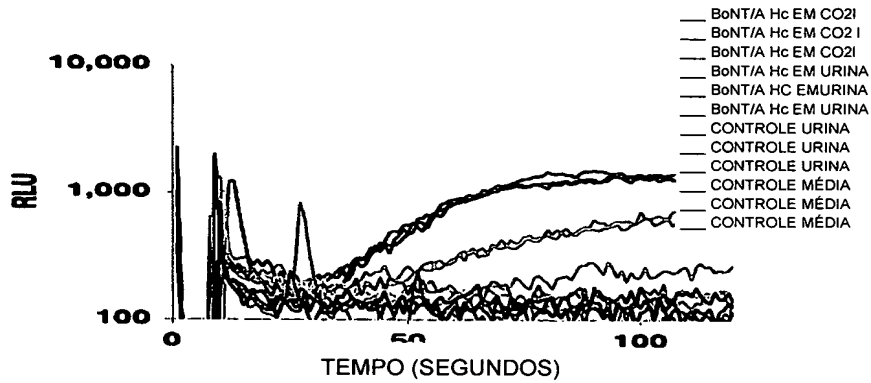


FIG. 61

PROTOCOLO DE ENSAIO COM ESFREGAÇÃO NASAL

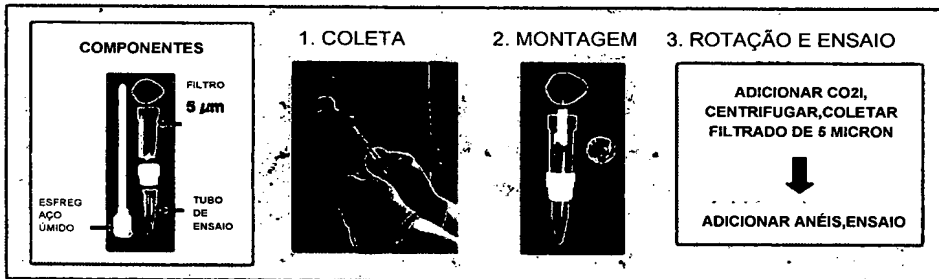


FIG. 62

AVALIAÇÃO DA DETECÇÃO DE BoNT/A Hc EM ESFREGAÇÃO NASAL

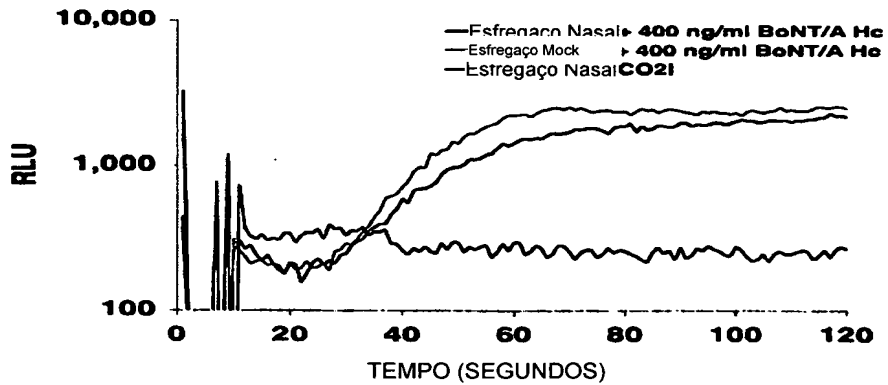


FIG. 63

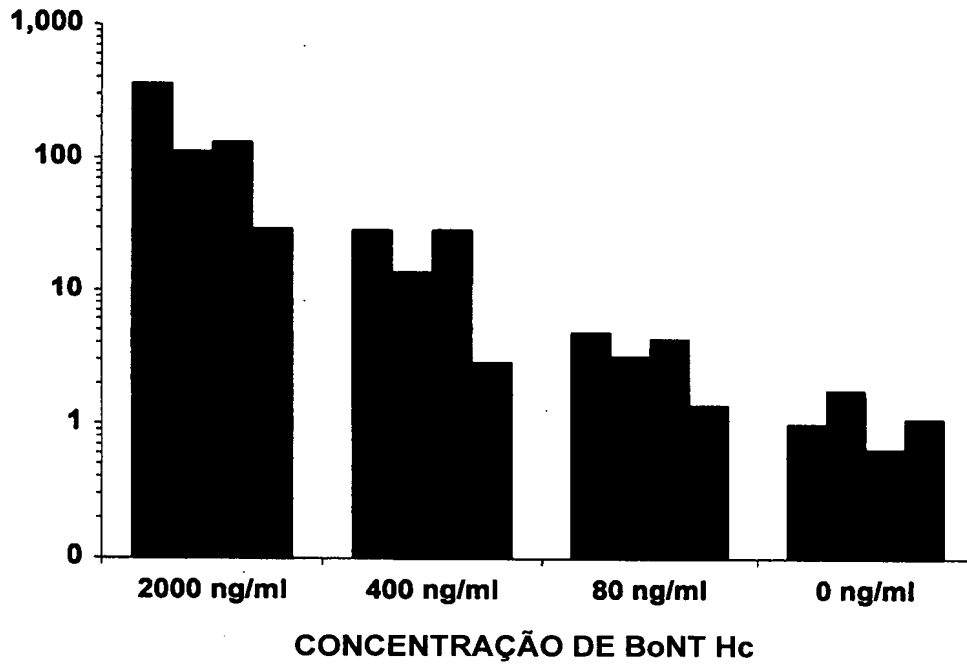


FIG. 64

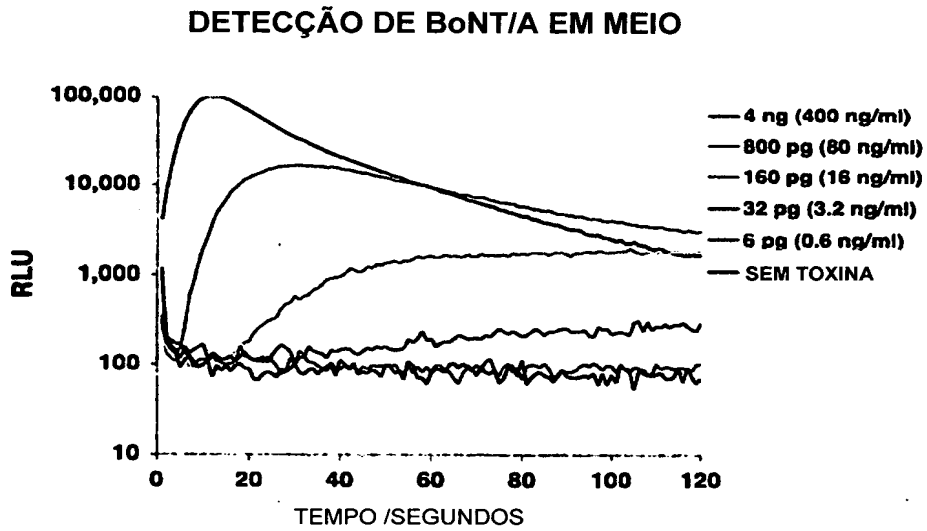
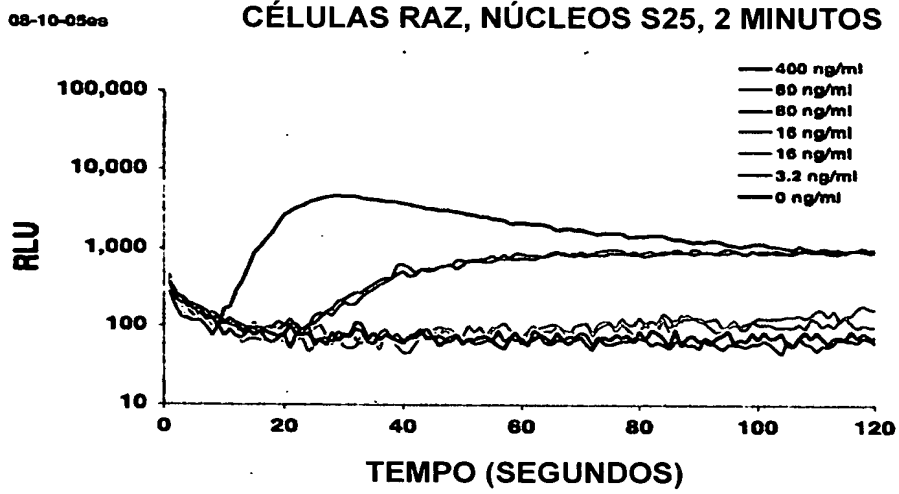
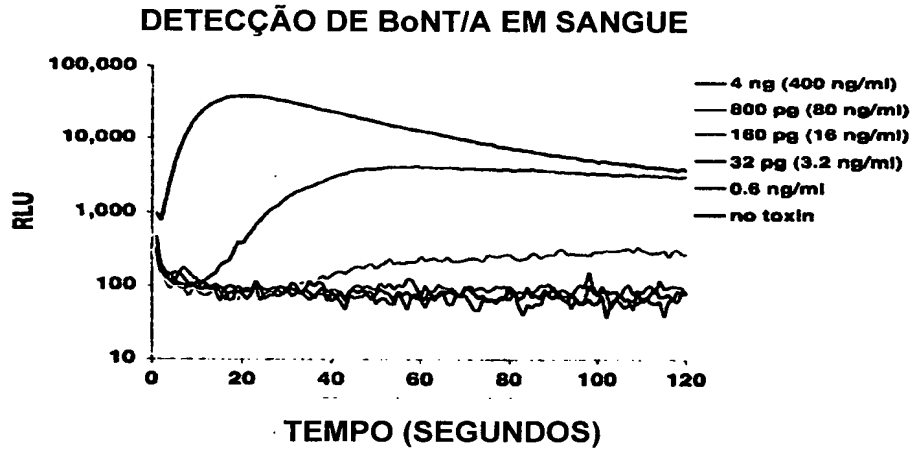


FIG. 65



**FIG. 66**



**FIG. 67**

EFEITO DO COMPRIMENTO DE CADEIA NA DETECÇÃO

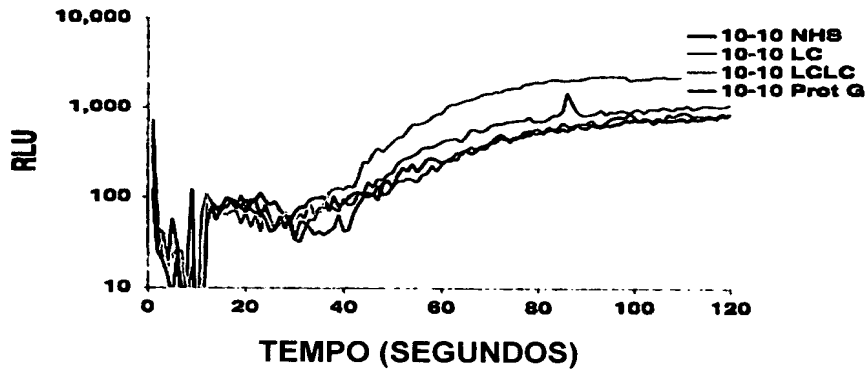


FIG. 68

11-2-05es NÚCLEOS DE 10-10 BIOTIN A, 15 MINUTOS DE LIGAÇÃO

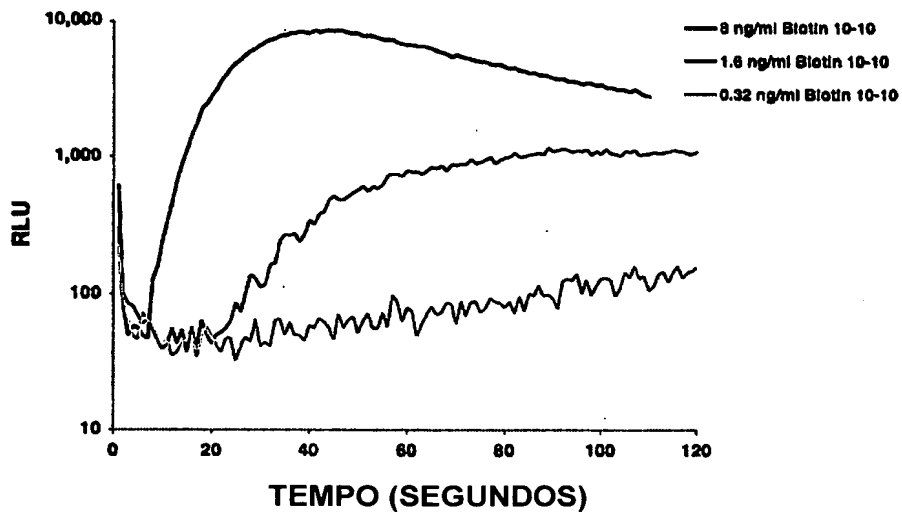


FIG. 69

11-2-05es NÚCLEOS DE 10 - 10 + 2 - 4 BIOTINA, 15 MINUTOS DE LIGAÇÃO

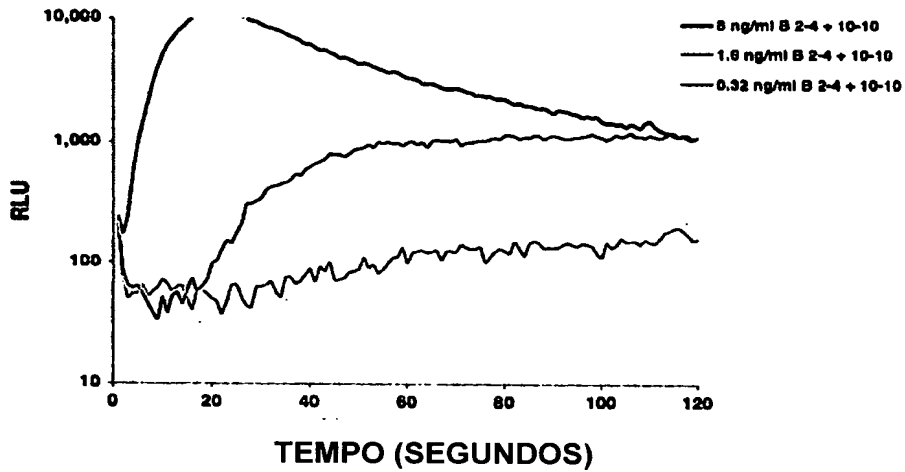


FIG. 70

NÚCLEOS DE 6E10 - 10 ESTREPTAVIDINA, 0,32 ng/ml BoNT/A DURANTE UMA NOITE, DILUIÇÃO DE NÚCLEOS, CÉLULAS 6B2 - 2

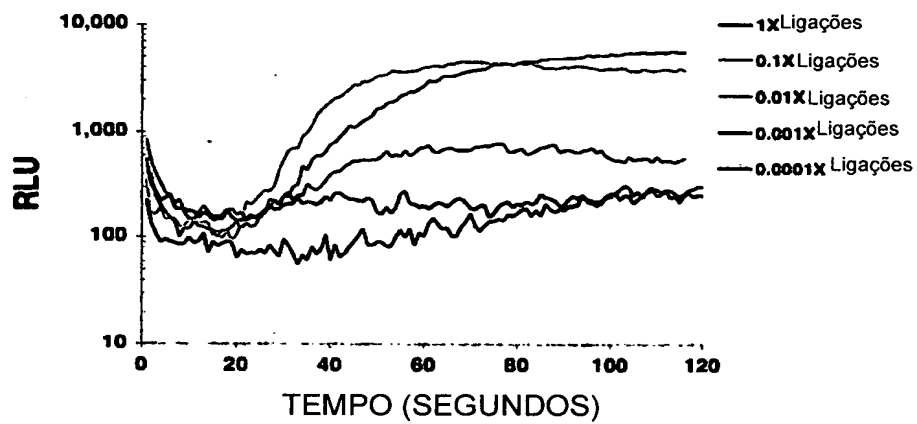
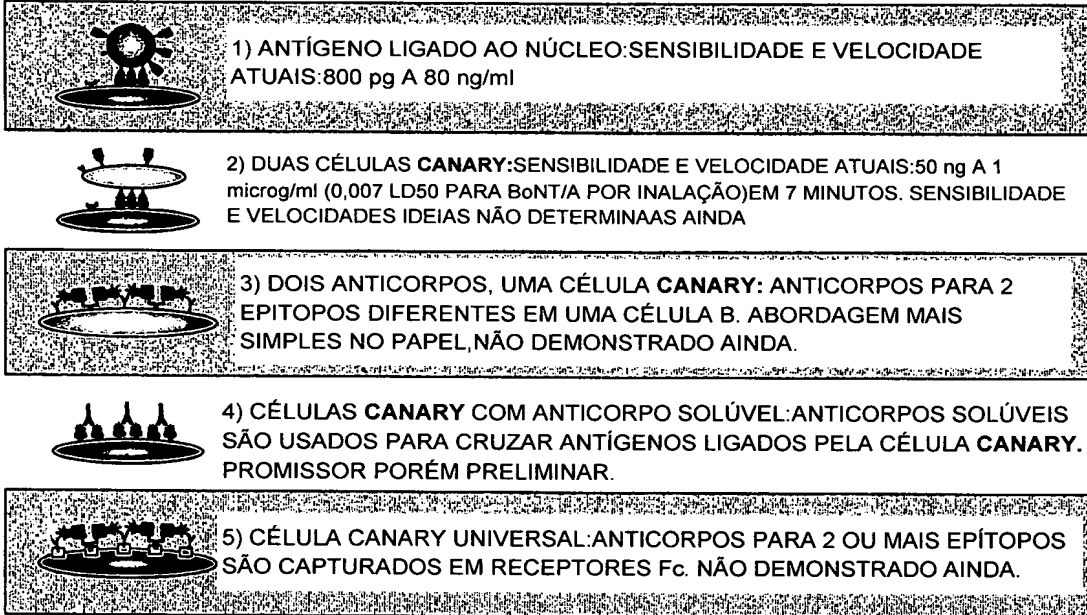


FIG. 71

50/135

**DETECÇÃO DE TOXINA: 5 ABORDAGENS**



**FIG. 72**

CÉLULAS U937 PODEM SER PREPARADAS PARA DETECTAR DIVERSOS PATÓGENOS DIFERENTES

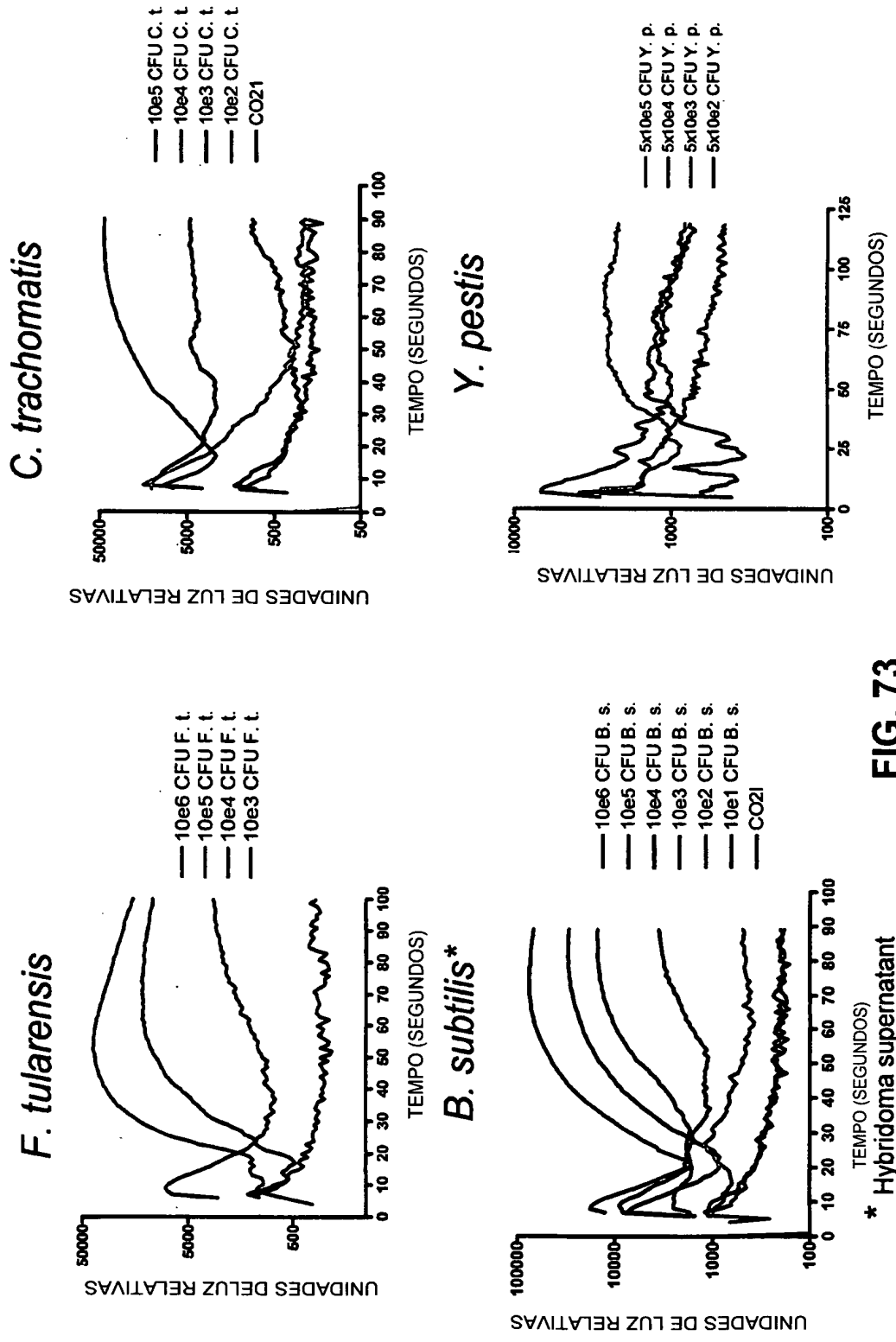
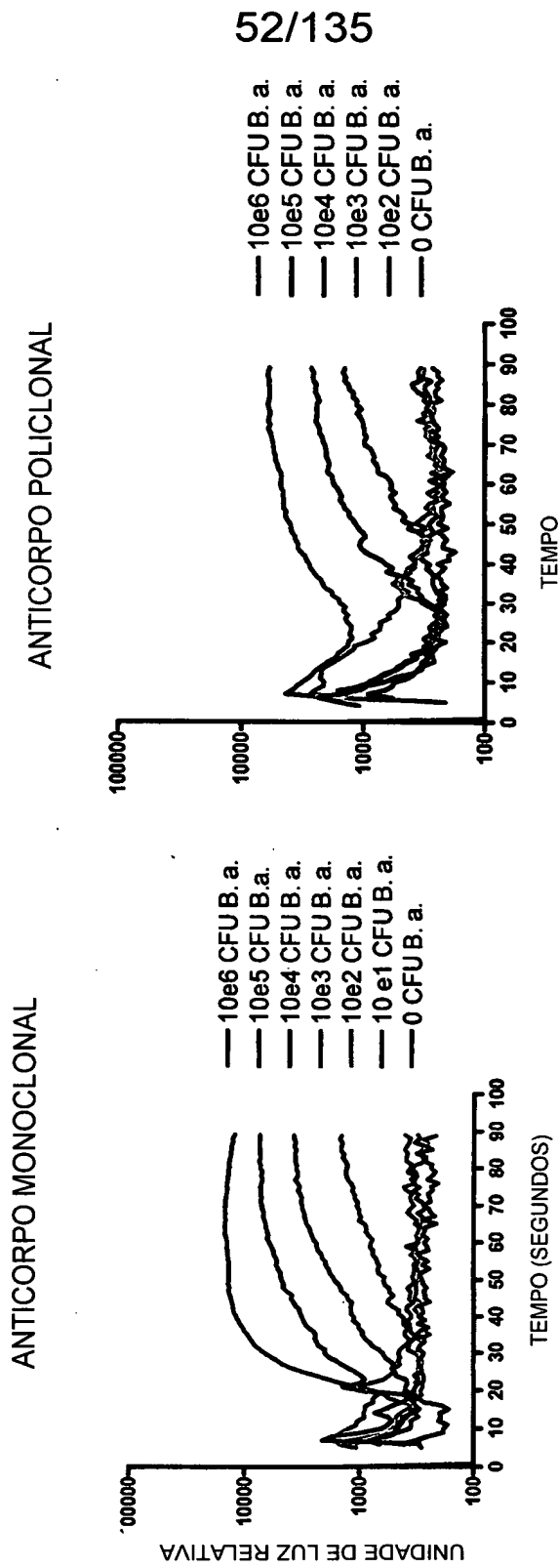


FIG. 73

\* Hybridoma supernatant

CÉLULAS U937 DE AEQUORINA CARREGADAS COM ANTICORPO  
 MONOCLONAL OU POLICLONAL PODEM DETECTAR ESPORO DE  
 B. ANTHRACIS



ANTICORPO POLICLONAL FUNCIONA BEM, NO ENTANTO DETECTA UMA ORDEM DE  
 MAGNITUDE MENOR AUE OS ANTICORPOS MONOCLONAIS

FIG. 74

## PROETO FcR:LINHAS DE CÉLULA

53/135

\* ATUALMENTE EXISTE BOA LINHA DE CÉLULA EXPRESSIVA DE AEQUORINA (U931#4) PARA ENSAIO RECEPTOR Fc

\_\_\_ GENE AEQUORINA ESTÁ EM VETOR BLASTICIDINA pEF

\_\_\_ CÉLULAS ESTÃO EM CULTURA DE RPMI/10% FBS MEIO COMPLETO MAIS 0.8 mg/ml BLASTICIDINA

\* TAMBÉM POSSUEM 3 CLONES EXPRESSANDO CHIMERA RGFP-AEQUORINA

\_\_\_ GENE AEQUORINA EGFP ESTÁ EM pCDNA3.1 (CMV) VETOR G418

\_\_\_ CPÉLULAS ESTÃO EM CULTURA DE RPMI/10% FBS MEIO COMPLETO MAIS 0.8 mg/ml G418

FIG. 75

## PROTOCOLO PARA PREPARO/CARREGAMENTO DE CÉLULAS U937

### \* DIA 1

CÉLULAS AEUORINA U937 OU EGFP-AEUORINA EM UMA CONCENTRAÇÃO DE  $\sim 0,5 \times 10^6$  CÉLULAS/ml SÃO PREPARADAS COM GAMMA IFN (200 ng/ml)

\_ NÃO NECESSITA PREPARO DE DMSO

- GAMMA IFN PADRÃO ESTÁ EM 100 ng/ $\mu$ l (PORTANTO UTILIZE 2  $\mu$ l POR ml DE CÉLULA EM CULTURA)

- TÍPICAMENTE PREPARA-SE 5mls DE CÉLULAS A  $0,5 \times 10^6$  CÉLULAS/ml. ISTO RENDE 3-5 TUBOS EPI PARA ENSAIO

### \* DIA 2:

CÉLULA U937 COM PREPARO GAMMA IFN SÃO CONTADAS E O NÚMERO DESEJADO DE CÉLULAS É CARREGADO COM 4x COLENTERAZINA

- PARA CADA TUBO EPI PREPARAR  $0,75 \times 10^6$  CÉLULAS EM 1MM  $\mu$ l DE CO<sub>2</sub>1 CONTENDO 4 x COEL (200  $\mu$ M FINAL)

- CÉLULAS SÃO INCUBADAS NO ESCURO POR 2 HORAS A R.T.

- CÉLULAS SÃO ENTÃO LAVADAS 3 VEZES EM CO<sub>2</sub>1 E RE-SUSPENSAS A  $0,5 \times 10^6$  CÉLULAS/ml

- CÉLULAS SOFREM ROTAÇÃO DURANTE UMA NOITE A RT E ESTÃO PRONTAS PARA USO NO DIA SEGUINTE

## PROTOCOLO PARA ENSAIO FC

CÉLULAS U937 CARGADAS COM COLENTERAZINA 4x SÃO PREPARADAS COM O ANTICORPO DESEJADO COMO SEGUIE:

### 1. ADICIONAR ANTICORPO ADEQUADO:

- PARA ANTICORPO PURIFICADO (MONOCLONAL OU POLICLONAL) USAR DE MODO GERAL 10-100 ug/ml ANTICORPO.

55/135

- PARA ANTICORPOS SUPERNATENTES (alfa-BS) USAR DE MODO GERAL RAZÃO DE 1:1 DE SUPERNATENTE PARA CÉLULAS.

### 2. INCUBAR CÉLULAS COM ANTICORPOS A 37C POR 5-30 MINUTOS

3. CÉLULAS PODEM SER USADAS DIRETAMENTE EM ENSAIO CANARY TRADICIONAL (A LAVAGEM DAS CÉLULAS É OPCIONAL). OBS. : SE USAR ANTICORPO SUPERNATENTE E NÃO LAVAR AS CÉLULAS ANTES DO ENSAIO: AJUSTAR O VOLUME DE CÉLULAS USADAS NO ENSAIO PARA OBTER 10,000 CÉLULAS PARA O ENSAIO.

FIG. 77

## 1. ENSAIO DE OUTROS MÉTODOS PARA MELHORAR SENSIBILIDADE DE RECEPTOR FC U937

- GERAR LINHA DE CÉLULA U937 COM AEQUORINA SOB CONTROLE DE PROMOTOR CMV
- PODE-SE TENTAR GERAR LINHAS DE CÉLULA MACRÓFAGAS ADICIONAIS (ISTO É, HL60, THP-1,ETC.) EXPRESSANDO LINHAS ALTERNATIVAS DE CÉLULA AEQUORINA, TAIS COMO LINHA DE CÉLULA MACRÓFAGA.
- GERAÇÃO DE CÉLULAS JURKAT QUE EXPRESSAM AEQUORINA E RECEPTOR FC.

## FIG. 78

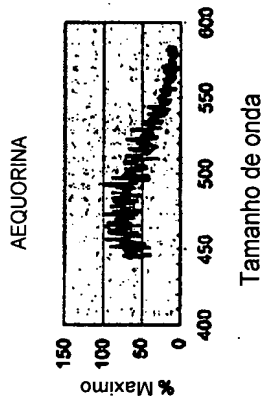
## 2. DESENVOLVER CÉLULAS CANARY (M12g3R E U937) COM EMISSÃO DE CORES DIFERENTES USANDO VARIANTES GFP

- QUIMERA AEQUORINA-EGFP
- A EMISSÃO DE AEQUORINA A 488nm É ABSORVIDA PELO EGFP E O COMPRIMENTO DA LUZ EMITIDA PELAS CÉLULAS SOB ESTÍMULO É ALTERADA PARA 509 nm
- ESTRUTURAS DE QUIMERA AEQUORINA-EGFP FORAM GERADAS PELA JUNÇÃO POR SOBREPOSIÇÃO DE PCT E CLONADA EM pCDNA3.1 (VETOR CMV/G4180).
- CÉLULAS U937 E M12g3R FORAM TRANSFECTADAS COM AEQUORINA-EGFP.
- A CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAS DE CÉLULA QUIMÉRICAS MOSTRA QUE FUNCIONAM TÃO BEM COMO A AEQUORINA PURA.

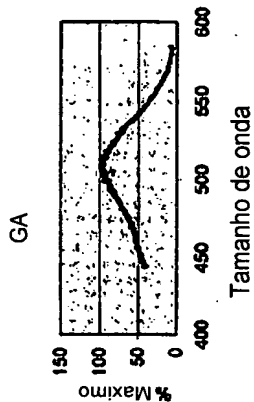
## FIG. 79

ALTERAÇÃO NA EMISSÃO DE LUZ PARA AEQUORINA

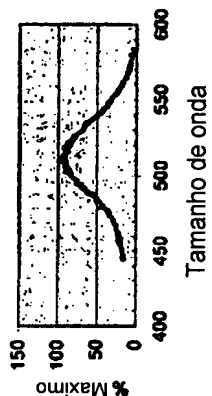
AEQUORINA



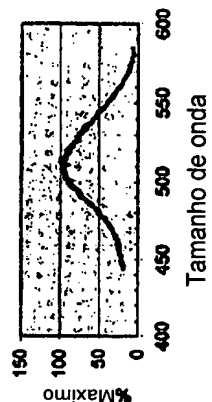
EGFP-AEQUORINA



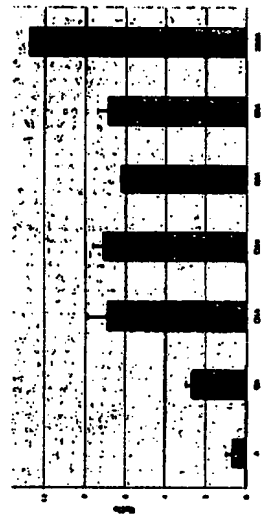
G5A



SG5A



RAZÃO DE 5000nm VERDE / 450 nm AZUL

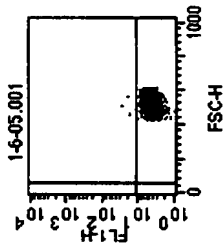


PROTEÍNA AEQUORINA FLUORESCENTE QUIMÉRICA VERDE COMO BIOLUMINESCENTE Ca<sup>2+</sup> +  
RELATOS A NÍVEL DE CÉLULA ÚNICA. BAUBET V, LE MOUËLLIC F, CAMPBELL AK, LUCAS-MEUNIER  
E, FOSSIER P., BRULETP.

FIG. 80

DETECÇÃO DE FLUORESCÊNCIA GFP POR FACS

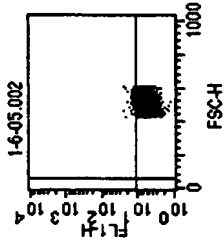
M12 AEQ (Dig45-1)



File: 1-6-05.001

Quad Y Geo Mean ***	
UL	16.87
UR	4.20
LL	***
LR	***

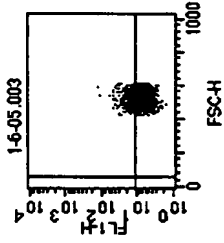
M12 Clone 6



File: 1-6-05.002

Quad Y Geo Mean ***	
UL	12.48
UR	5.65
LL	***
LR	***

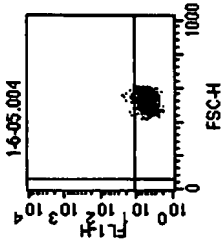
M12 Clone 7



File: 1-6-05.003

Quad Y Geo Mean ***	
UL	14.93
UR	6.92
LL	***
LR	***

M12 Clone 41

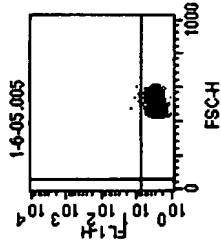


File: 1-6-05.004

Quad Y Geo Mean ***	
UL	12.78
UR	5.87
LL	***
LR	***

SEM  
COLENTERAZINA

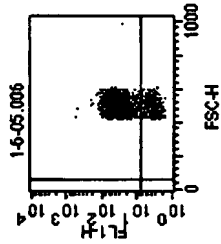
M12 AEQ (Dig 45-1)



File: 1-6-05.005

Quad Y Geo Mean ***	
UL	9.08
UR	3.10
LL	***
LR	***

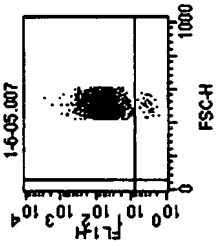
M12 Clone 6



File: 1-6-05.006

Quad Y Geo Mean ***	
UL	36.77
UR	3.61
LL	***
LR	***

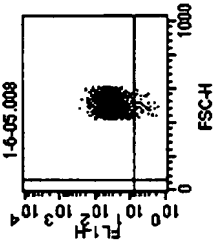
M12 Clone 7



File: 1-6-05.007

Quad Y Geo Mean ***	
UL	62.40
UR	3.42
LL	***
LR	***

M12 Clone 41



File: 1-6-05.008

Quad Y Geo Mean ***	
UL	38.30
UR	4.19
LL	***
LR	***

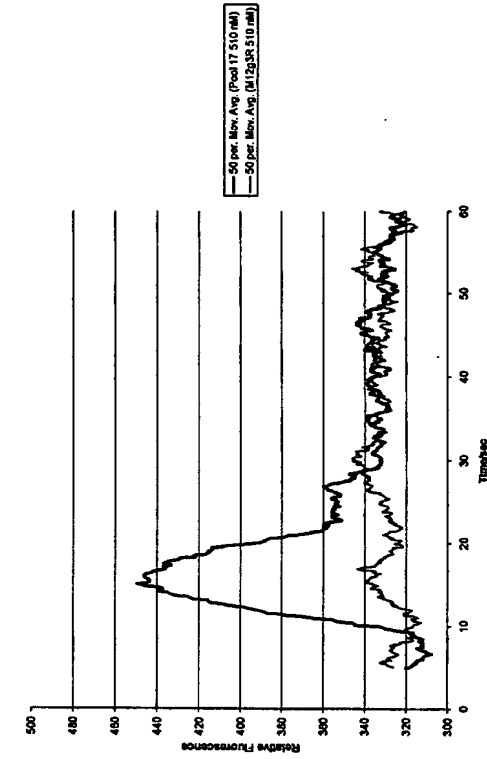
CÉLULAS  
CARREGADAS DE  
COLENTERAZINA

FIG. 81

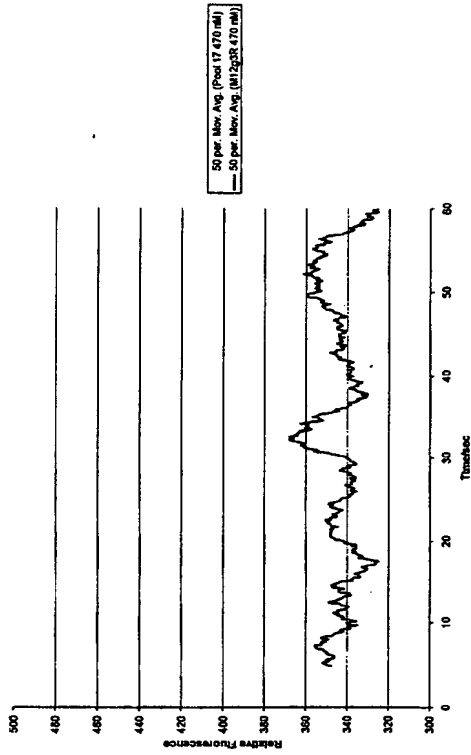
# DETECÇÃO DA ALTERAÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA DA AEQUORINA POR ESPECTROFOTOMETRO

59/135

EMIÇÃO DE ESPECTRO DE 510 nm INTEGRADO  
EM 5 SEGUNDOS



EMIÇÃO DE ESPECTRO DE 470 nm INTEGRADO EM 5  
SEGUNDOS



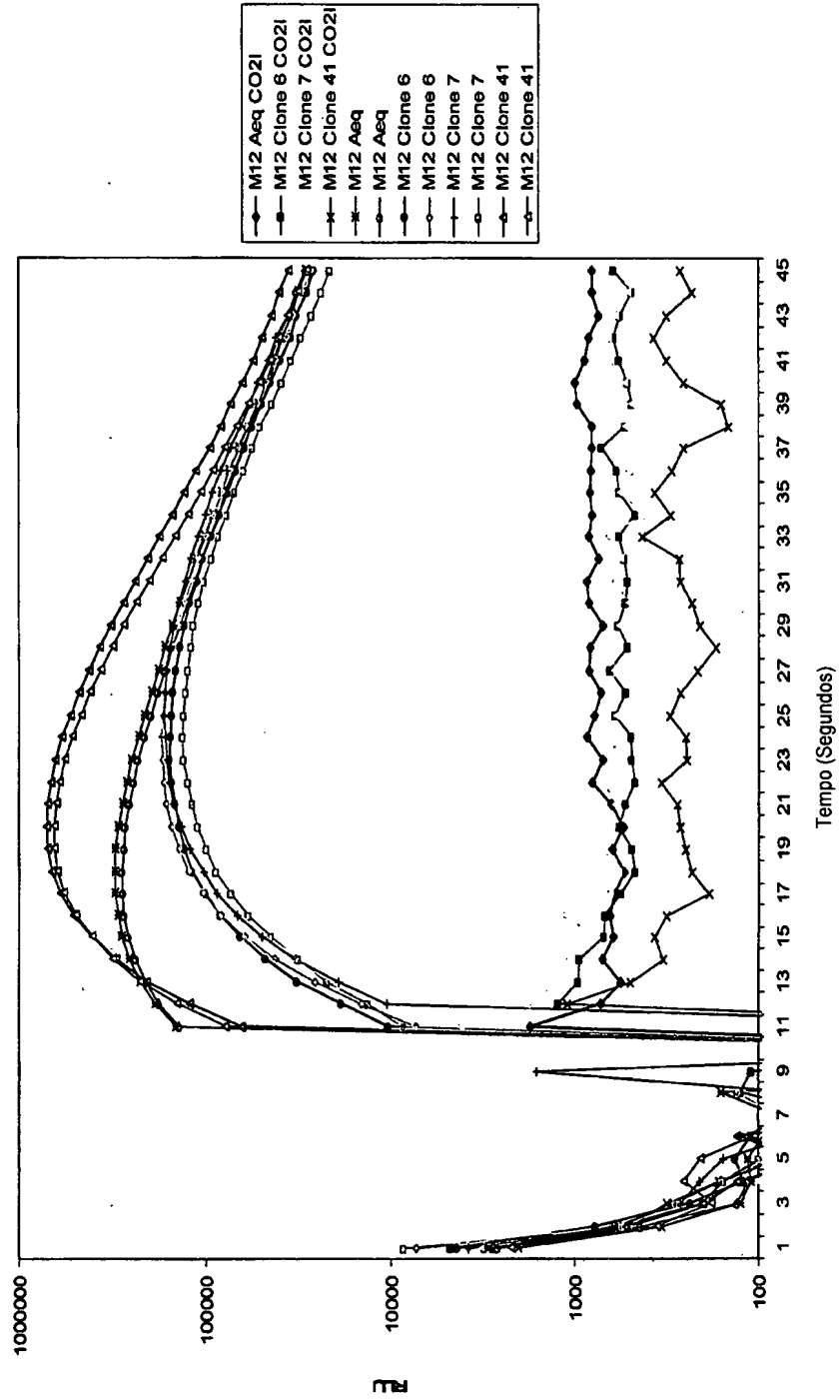
CÉLULAS AEQUORINA M12g3R OU M12g3R EGFP-AEQ (POOL 17) FORAM ESTIMULADAS COM  
UM a-IgM E MONITORADAS POR UM PERÍODO A 470nm OU 510 nm

FIG. 82

# CLONES DE AEQUORINA-EGFP m12g3R FUNCIONAM DE MODO SIMILAR A CÉLULAS DE AEQUORINA M12g3R PURA

60/135

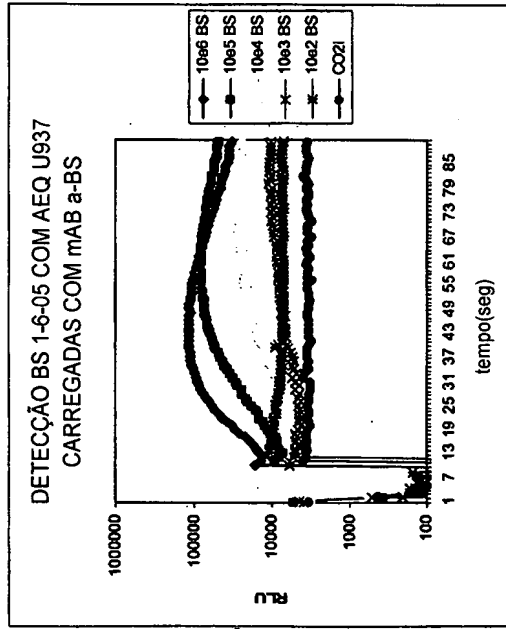
TESTE DE CLONAGEM DE Aeq-EGFP 1-6-05 M12f3R:ESTÍMULO COM  $\alpha$ -IgM



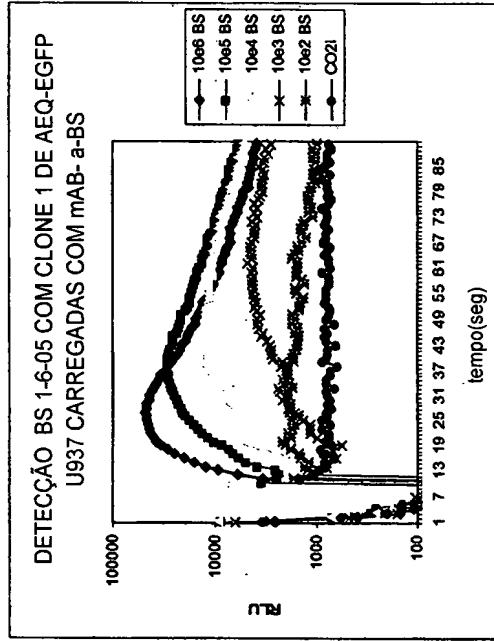
CÉLULAS ESTIMULADAS COM 5 $\mu$ l DE  $\alpha$ -IgM

FIG. 83

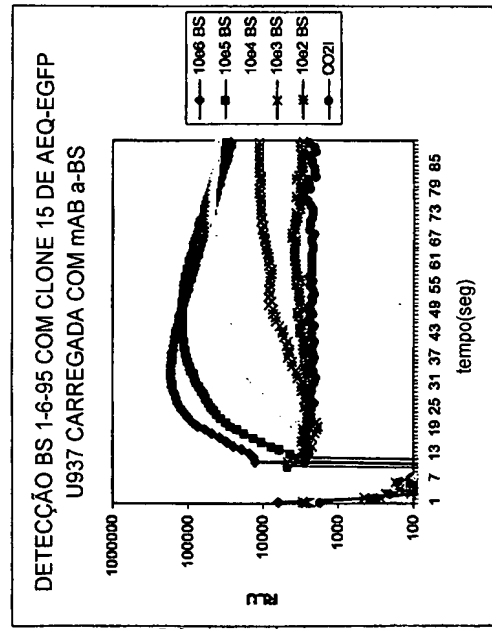
# DETECÇÃO DE ESPORO B.S. COM CÉLULAS AQUORINA U937 E AEQUORINA-EGFP U937



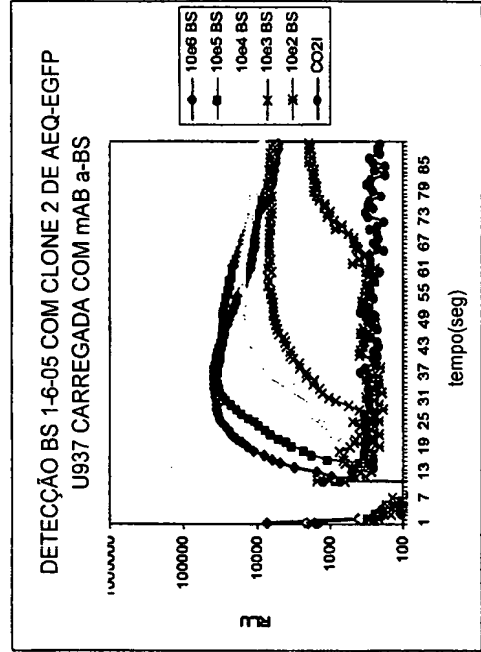
**U937#4**  
Aeq.



**U937#1**  
EGFP-  
Aeq.



**U937#2**  
EGFP-  
Aeq.

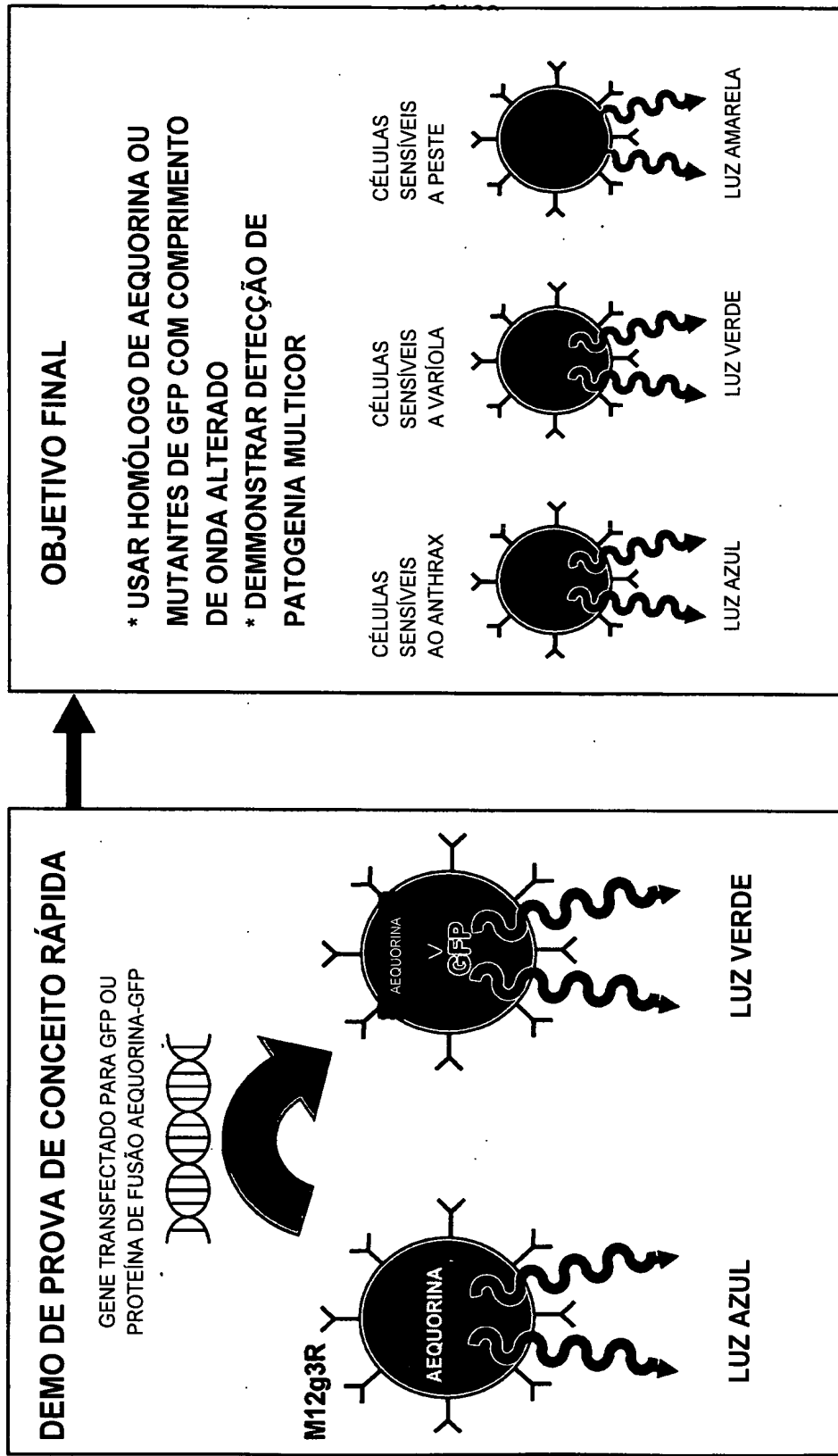


**U937#15**  
EGFP-  
Aeq.

**FIG. 84**



# CÉLULAS COM COMPRIMENTO DE ONDA DIFERENTES PARA DETECÇÃO DE SINAL MULTIPLEX



63/135

FIG. 86

# EMIÇÃO DE CORES DIFERENTES

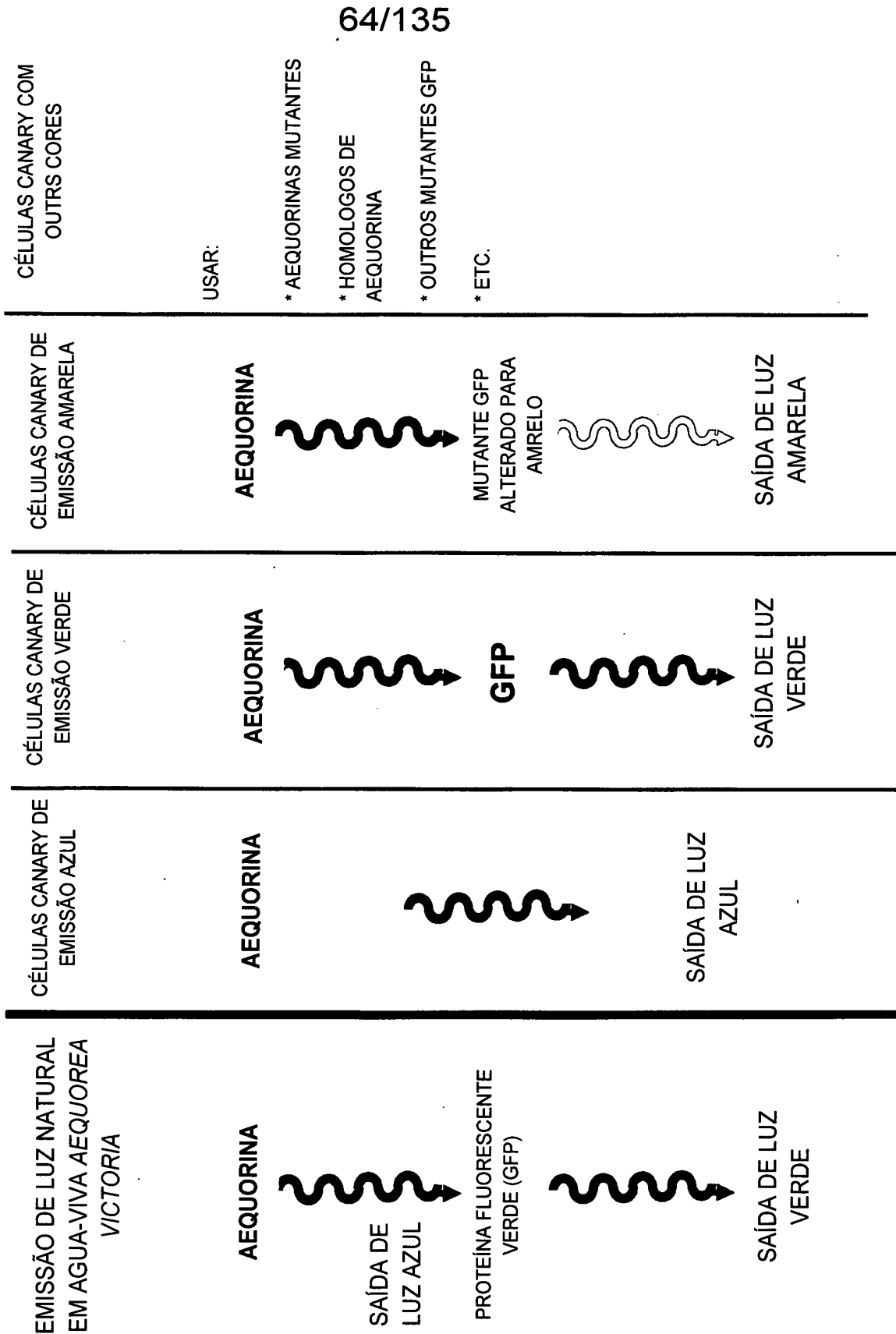


FIG. 87



# MÉTODO DE PRODUÇÃO DE NOVAS CÉLULAS CANARY PATÓGENO-ESPECÍFICAS

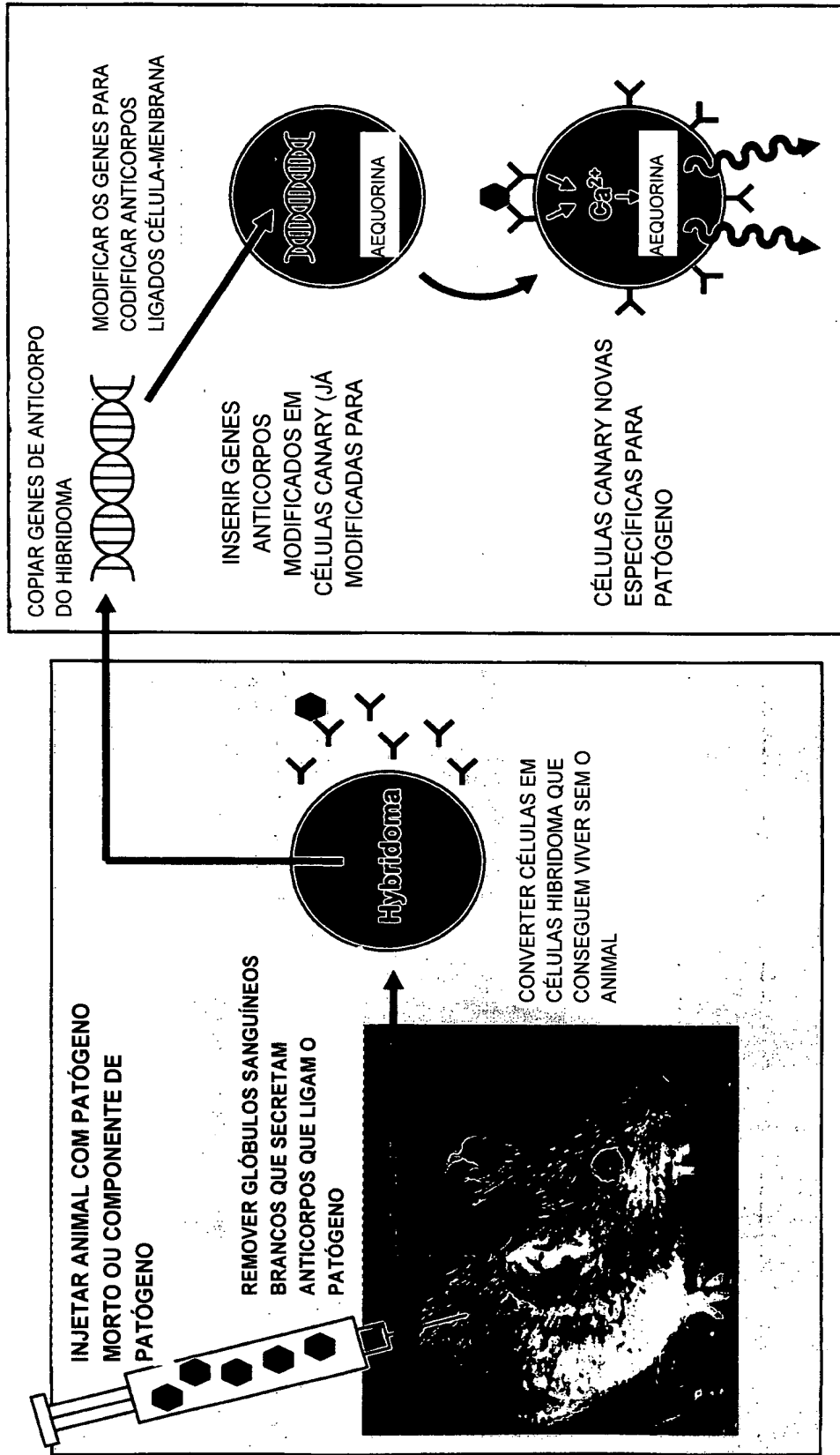


FIG. 89

# CÉLULAS CANARY UNIVERSAIS-ENGENHARIA DE CÉLULA RÁPIDA PARA NOVOS PATÓGENOS

67/135

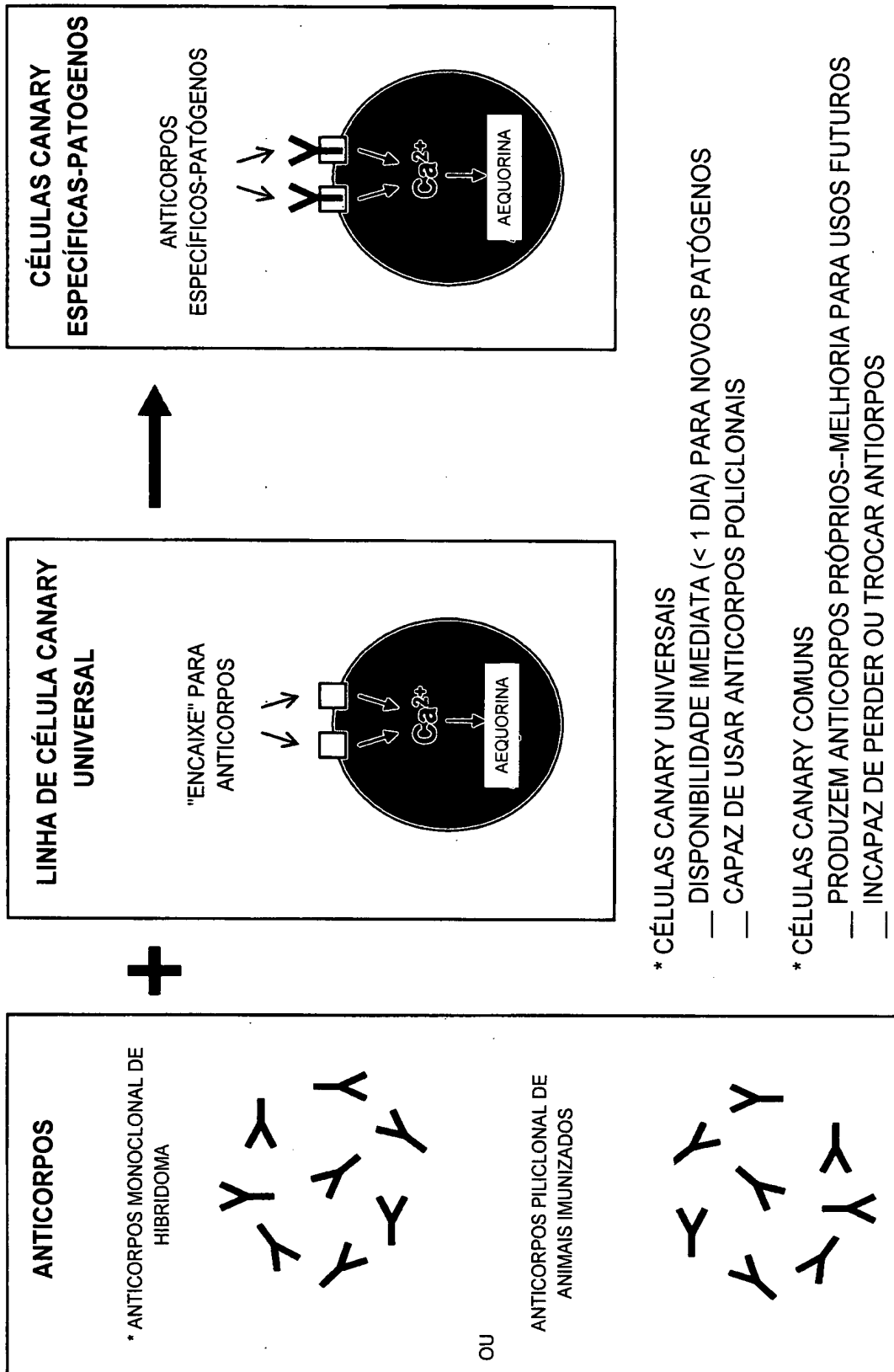


FIG. 90

## **USO DE CÉLULAS CANARY UNIVERSAIS**

- \* DETECÇÃO DE TOXINAS, TROPONINA CARDÍACA OU OUTROS ANTÍGENOS MONOVALENTES
- \* RESPOSTA RÁPIDA À DEFLAGRAÇÃO DE NOVOS PATÓGENOS CLÍNICOS (EX. HIV, EBOLA, SARS, VIRUS WEST NILE)
- \* RESPOSTA RÁPIDA A AGENTES DE GUERRA QUÍMICA GENETICAMENTE MODIFICADOS
- \* DETECÇÃO DE PATÓGENOS PARA OS QUAIS EXISTEM ANTICORPOS MAS NÃO HIBRIDOMAS
- \* TESTES INICIAIS PARA DETERMINAR A EFICÁCIA DE CANARY COM NOVOS ANTICORPOS OU NOVOS PATÓGENOS
- \* USOS COMERCIAIS DE CURTO PRAZO OU PEQUENO VOLUME QUE NÃO JUSTIFICAM MODIFICAR TODA UMA NOVA LINHA DE CÉLULA CANARY

68/135

**FIG. 91**

# ABORDAGENS EM POTENCIAL PARA MODIFICAR CÉLULAS CANARY UNIVERSAIS

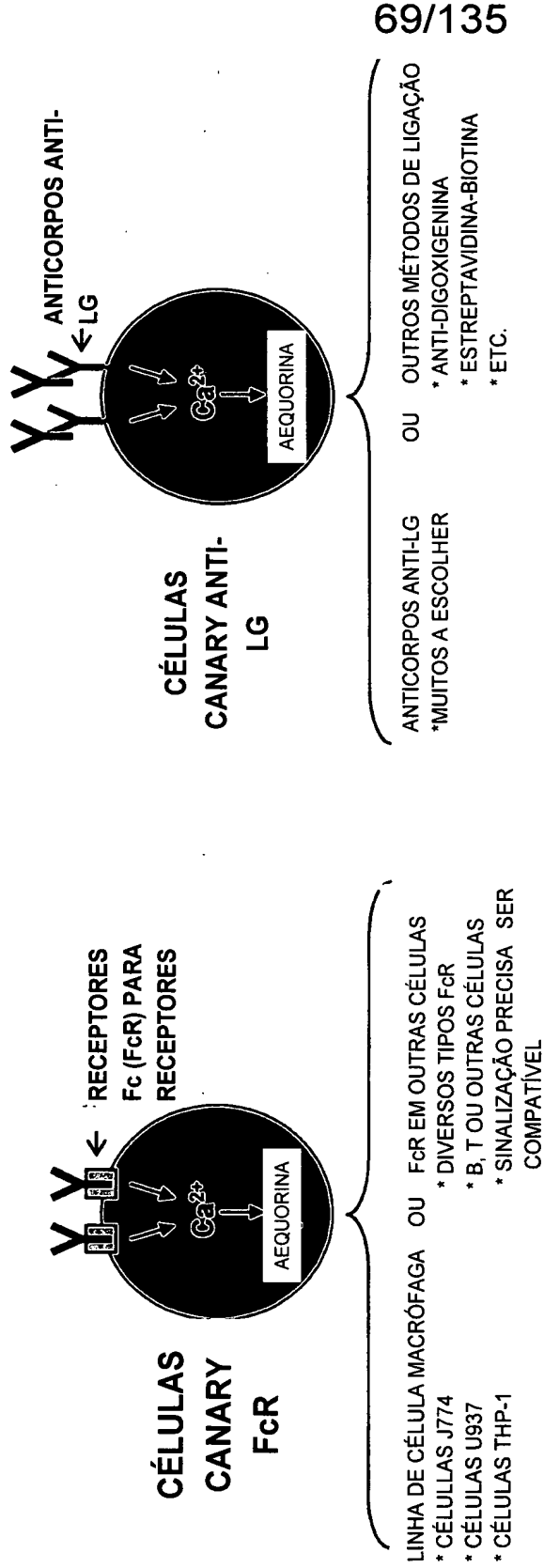


FIG. 92

# ABORDAGEM MACRÓFAGA

LINHAS DE CÉLULAS MACRÓFAGAS  
 \* J774: POSSUI SINALIZAÇÃO Ca<sup>2+</sup>

[D.J. Hackam (1997) *J. Exp. Med.* 186, 955;  
 J.D. Young (1984) *PNAS* 81, 5430]

- U937: has Ca<sup>2+</sup> SINALIZAÇÃO
- [A. Melendez (1998) *Curr. Biol.* 8, 210;  
 R.A. Floto (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 4753]
- THP-1: has Ca<sup>2+</sup> SINALIZAÇÃO
- [C. Ebel (2001) *Immunobiol. zuz.* 616;  
 E. Garcia (2001) *J. Leuk. Biol.* 70, 649]
- HL-60: Ca<sup>2+</sup> SINALIZAÇÃO DESCONHECIDA
- M1: Ca<sup>2+</sup> SINALIZAÇÃO DESCONHECIDA
- RAW 264.7: Ca<sup>2+</sup> SINALIZAÇÃO DESCONHECIDA

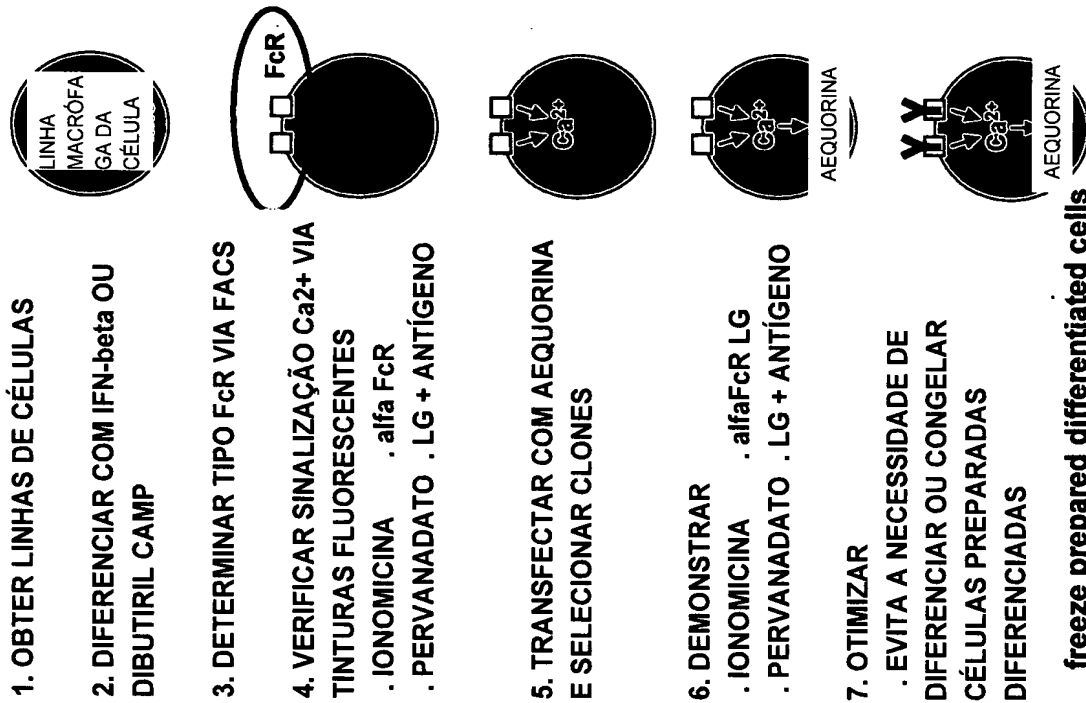
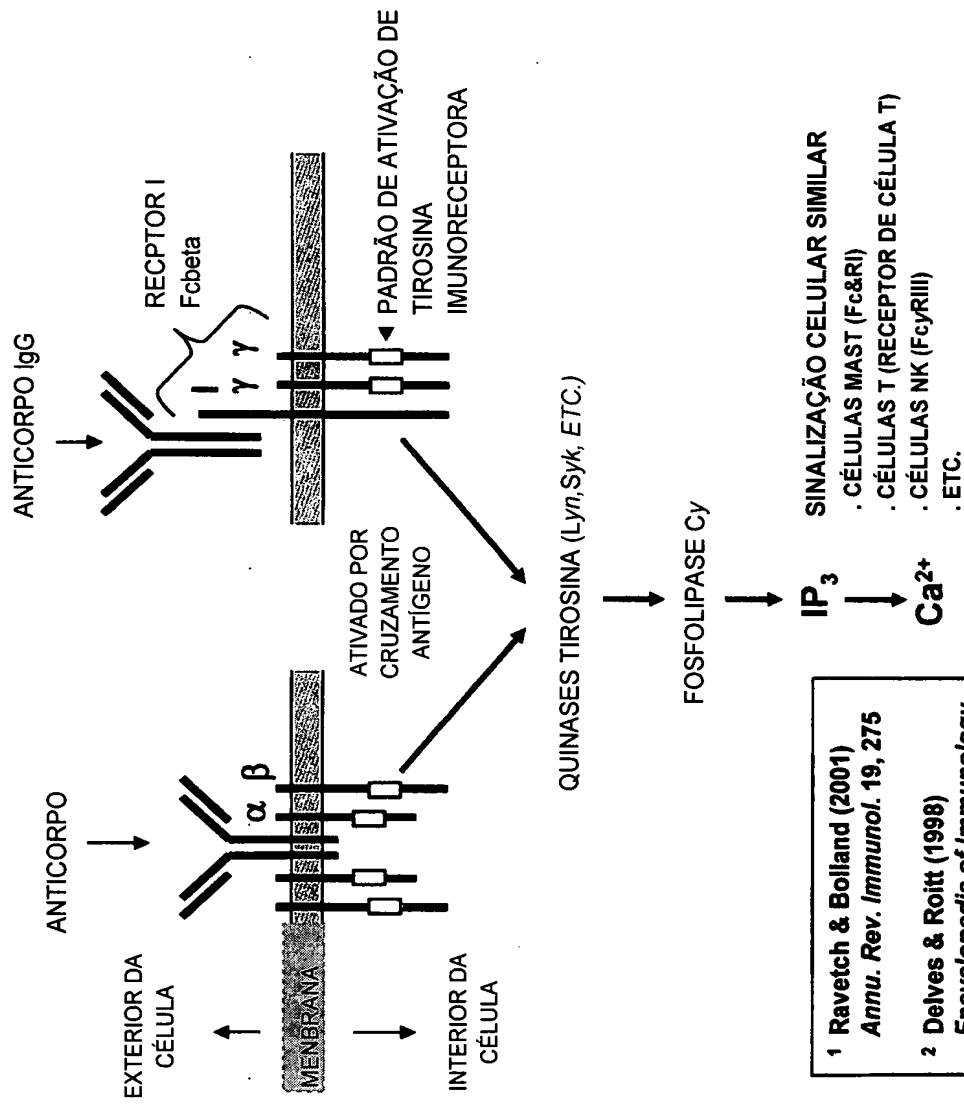


FIG. 93

**ABORDAGEM RECEPTOR Fc**  
**SINALIZAÇÃO MACRÓFAGA<sup>1,2</sup>**

**SINALIZAÇÃO DE CÉLULA B**



<sup>1</sup> Ravetch & Bolland (2001)  
*Annu. Rev. Immunol.* **19**, 275

<sup>2</sup> Delves & Roitt (1998)  
*Encyclopedia of Immunology*,  
 2nd ed., Academic Press

**FIG. 94**

**EXPERIÊNCIAS**

1. OBTENÇÃO DE GENES FcR
2. INSERÇÃO NOS VETORES DE EXPRESSÃO
3. VERIFICAÇÃO DE LINHAS DE CÉLULA FcR ENDÓGENAS
  - . CÉLULAS B . CÉLULAS MAST
  - . CÉLULAS T . CÉLULAS NK
4. VERIFICAÇÃO DE SINALIZAÇÃO Ca<sup>2+</sup> EM LINHAS DE CÉLULA
5. TRANSFEÇÃO DE VETORES FcR EM LINHAS DE CÉLULA E SELEÇÃO DE CLONES
6. DEMONSTRAR SINALIZAÇÃO VIA TINTURAS FLUORESCENTES
7. TRANSFEÇÃO COM AEGUORINA E SELEÇÃO DE CLONES
8. DEMONSTRAR

# ABORDAGEM ANTI-Ig

72/135

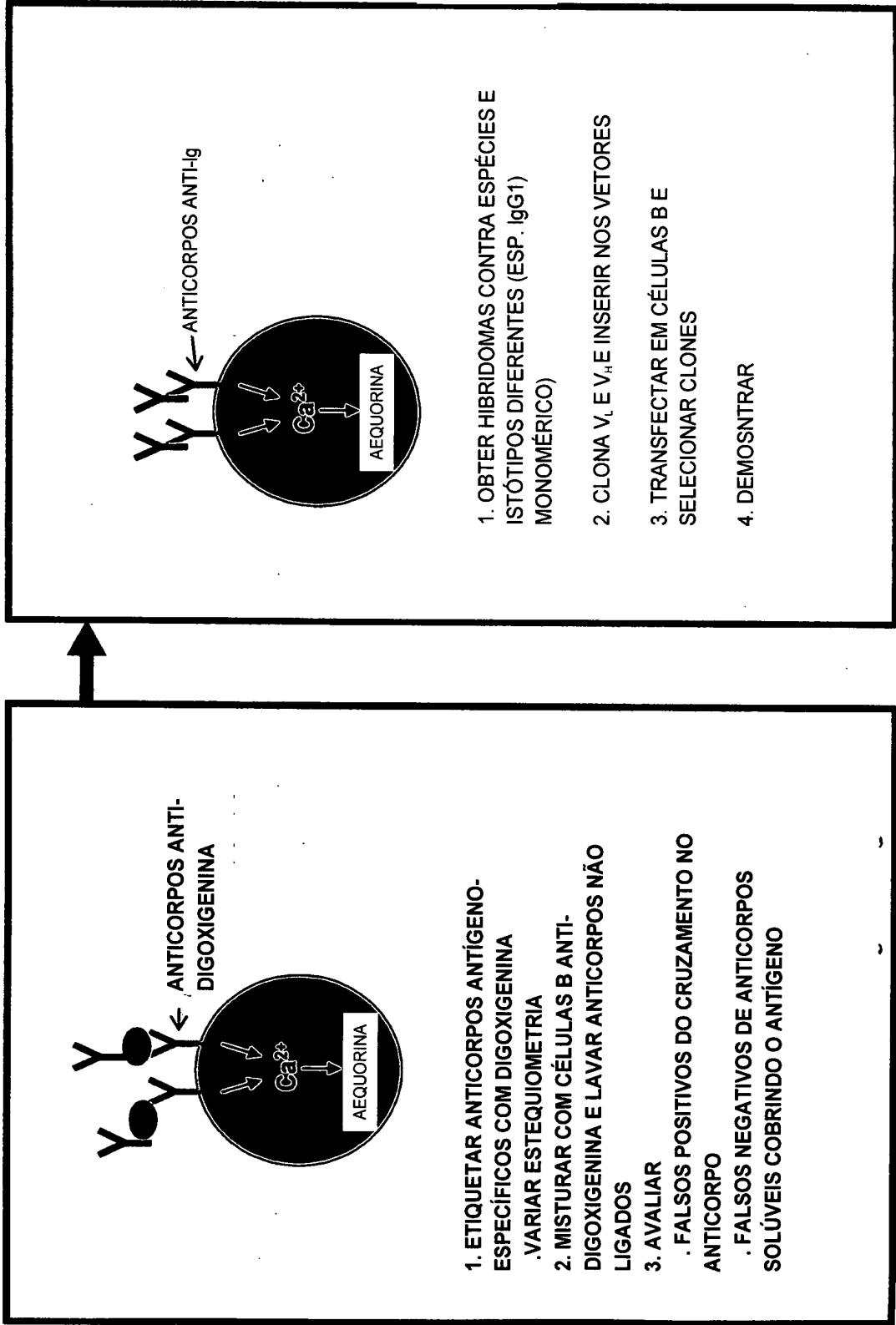
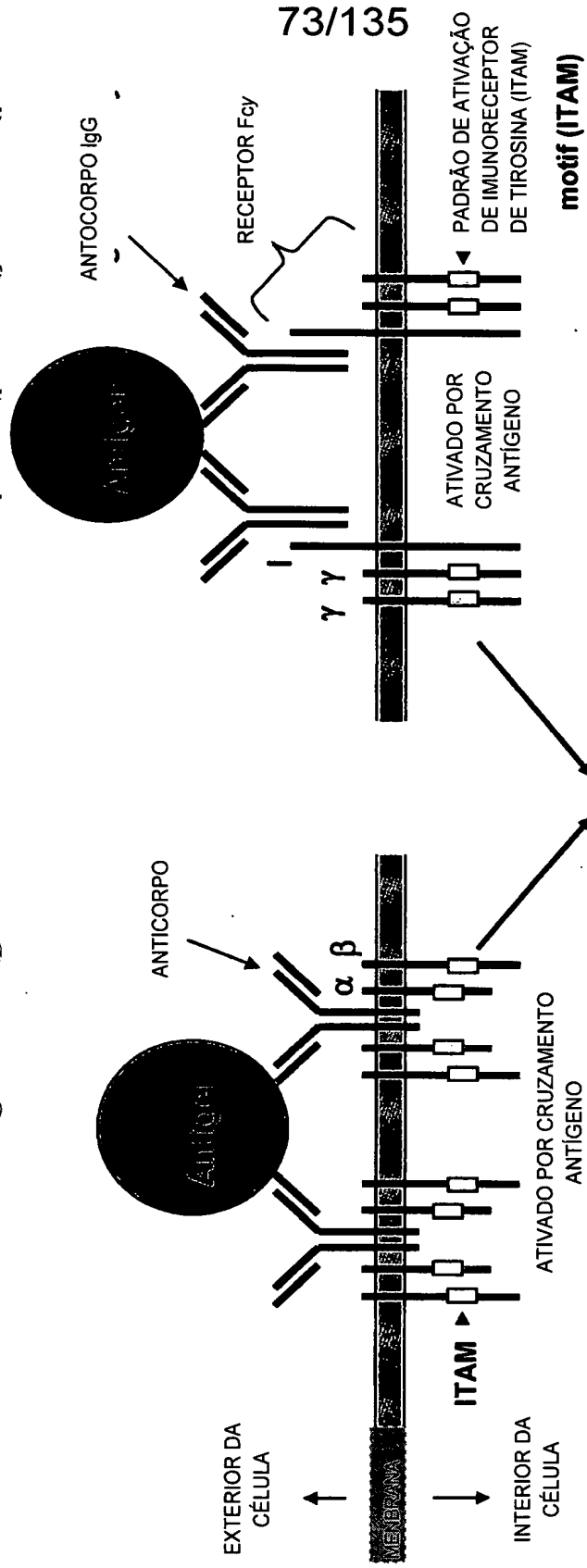


FIG. 95

SINALIZANDO EM CÉLULAS B X MACRÓFAGOS  
SINALIZAÇÃO EM CÉLULAS B      SINALIZAÇÃO MACRÓFAGA



**SINALIZAÇÃO CELULAR SIMILAR**

- CÉLULAS MAST (Fc&RI)
- CÉLULAS T (RECEPTOR DE CÉLULA T)
- CÉLULAS NK (FcγRIII)
- ETC.

• Etc.

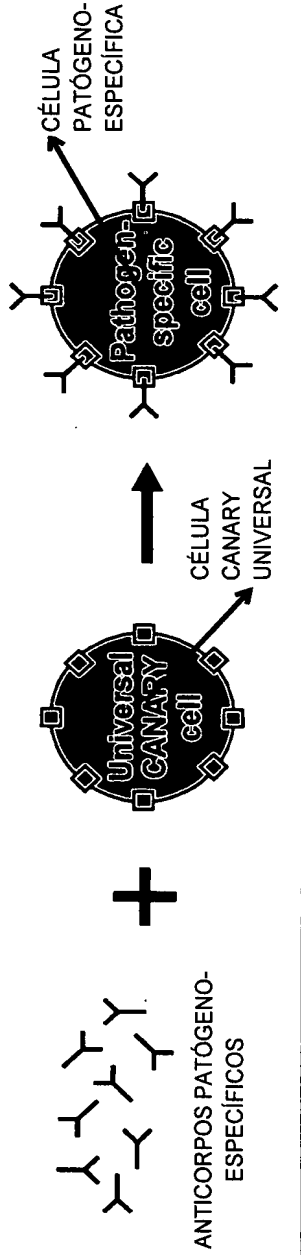
<sup>1</sup> J.V. Ravetch & S. Bolland (2001)  
*Annu. Rev. Immunol.* 19, 275.

<sup>2</sup> P.J. Delves & I.M. Roitt (1998)  
*Encyclopedia of Immunology*,  
2nd ed., Academic Press.

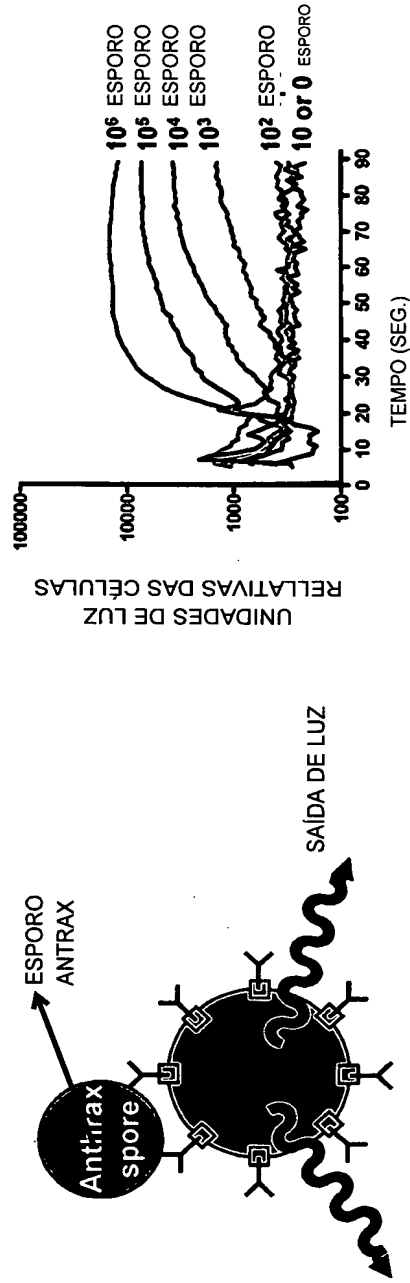
**FIG. 96**

**CÉLULAS CANARY UNIVERSAL**

ADAPTAR DENTRO DE ~1 HORA PARA DETECTAR NOVOS PATÓGENOS  
(VS. MESES PARA CÉLULAS CANARY PADRÃO)



**ILUSTRAÇÃO DA DETECÇÃO DE ANTRAX USANDO CÉLULAS UNIVERSAIS**



**FIG. 97**

# CÉLULAS UNIVERSAIS RECEPTORAS

75/135

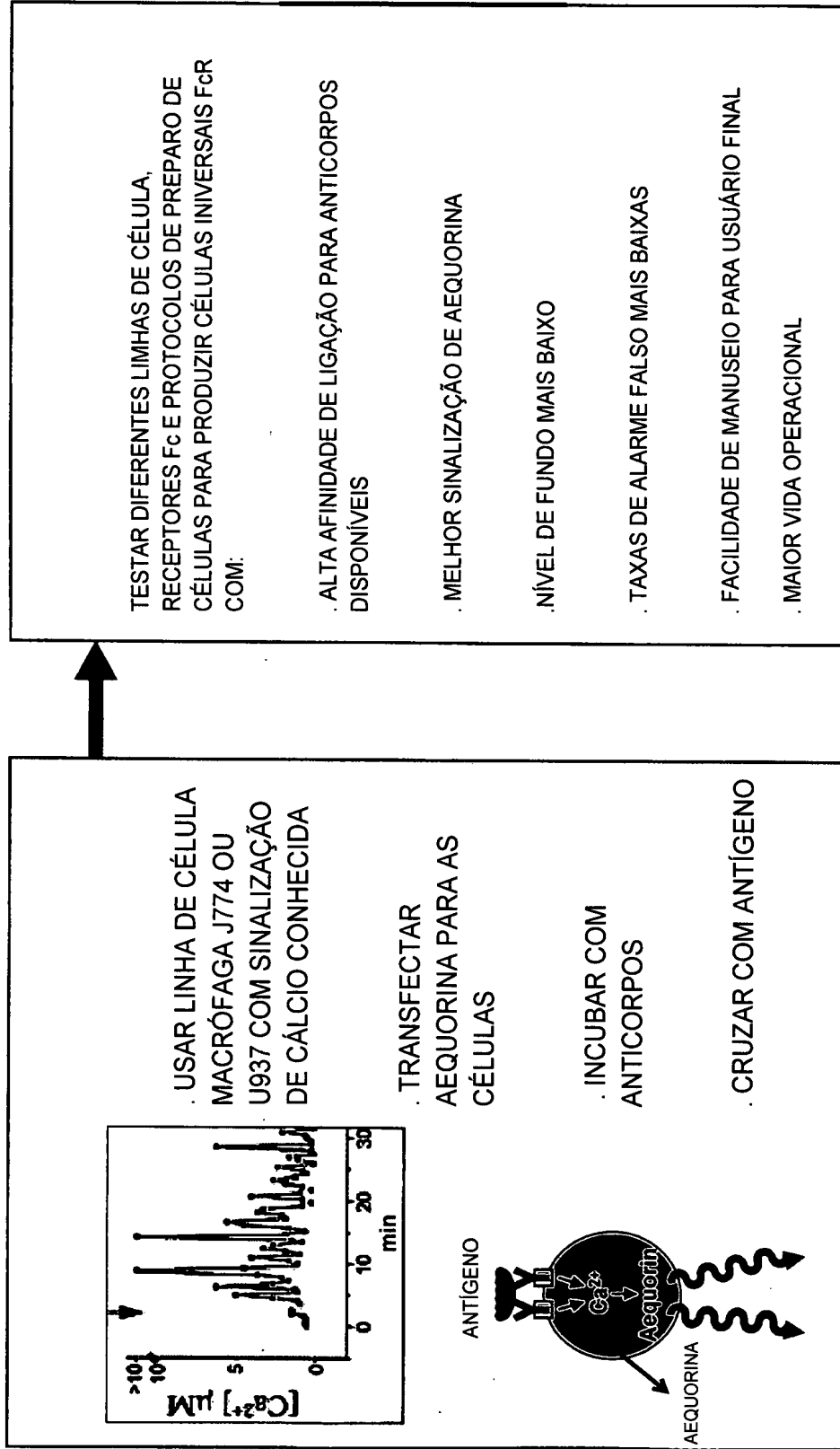


FIG. 98

## DETECÇÃO DE TOXINAS

CÉLULAS UNIVERSAIS DEVEM PERMITIR:

- . DEMONSTRAÇÃO PRECOCE DA DETECÇÃO DE TOXINA INICIAL
- . USO DE ANTICORPOS PARA TOXINAS MONOCLONAIS MIXTOS OU POLICLONAIS COMERCIALMENTE DISPONÍVEIS
- . AVALIAÇÃO RÁPIDA DE MUITOS ANTICORPOS DIFERENTES PARA ESCOLHA DOS MELHORES
- . CÉLULAS EM QUE TODOS OS ANTICORPOS SÃO FUNCIONAIS (vs. CÉLULAS ESPECÍFICAS PARA TOXINAS M12g3R, QUE TERIAM 4 CADEIAS LEVES E 3 CADEIAS PESADAS, DE MODO QUE APENAS 1/6 DAS COMBINAÇÕES CADEIA PESADA/CADEIA LEVE SERIA FUNCIONAL CONTRA A TOXINA
- . PRODUÇÃO SIMPLES DE TANTOS LOTES DE CÉLULAS ESPECÍFICAS PARA TOXINA DIFERENTES QUANTO FOREM DESEJADOS COM POUCO TRABALHO EXTRA

76/135

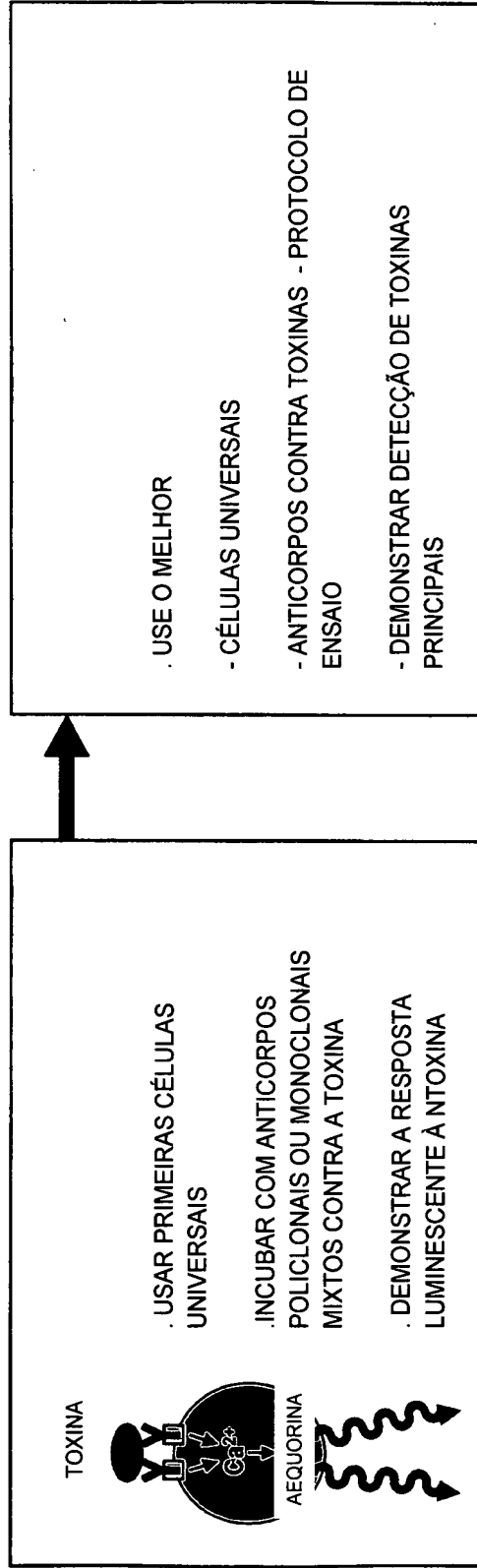


FIG. 99

77/135

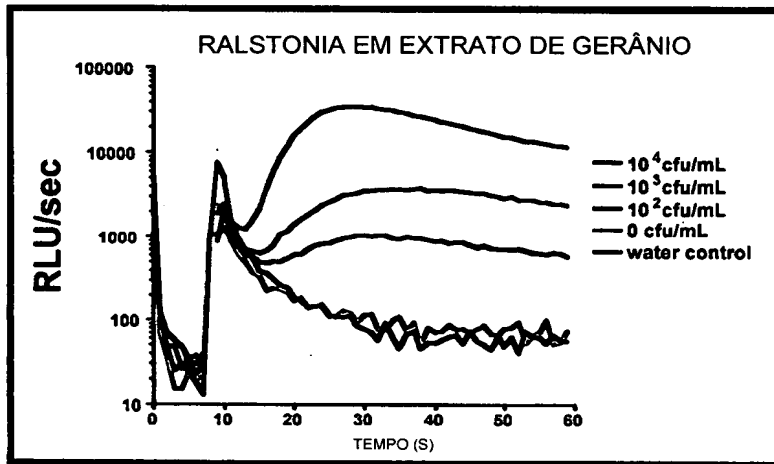


FIG. 100

ESTE GRÁFICO DEMONSTRA A DETECÇÃO DE 100 cfu/mL (TESTE 5cfu/CANARY) DE RALSTONIA SOLANACEARUM EM EXTRATO DE GERÂNIO USANDO O PROTOCOLO LISTADO ACIMA E DEMONSTRADO ABAIXO

### PROCESSAMENTO DE TECIDO DE GERÂNIO

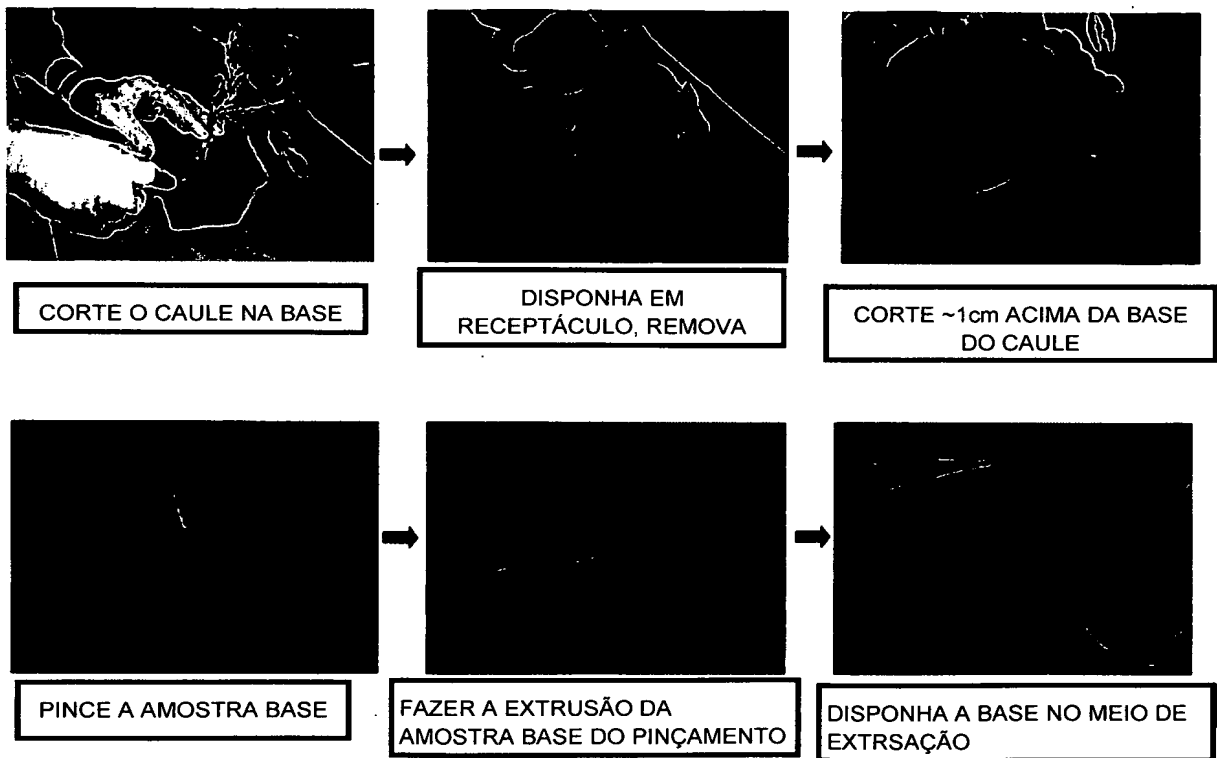


FIG. 101

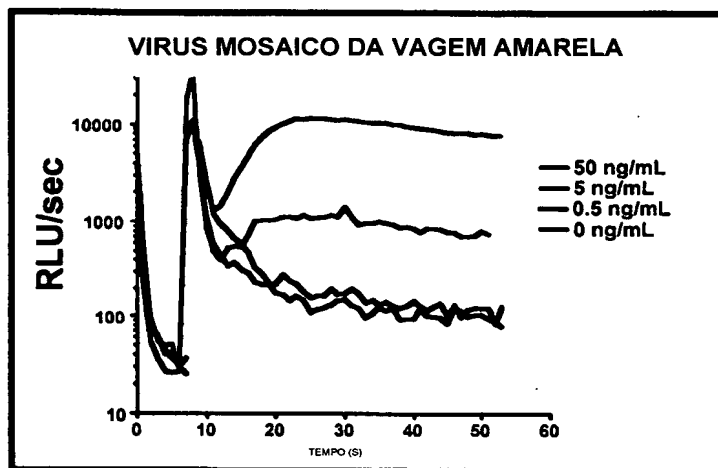


FIG. 102

ESTE GRÁFICO DEMONSTRA A DETECÇÃO DE 5ng/mL (TESTE 0,05 ng/CANARY) DE BYMV, UM POTYVÍRUS, USANDO O PROCESSO DE LIGAÇÃO POR CONTA DESCRITO ACIMA. ESTE MÉTODO PERMITE COLETA-DETECÇÃO EM MENOS DE 7 MINUTOS.

APARELHO E PROTOCOLO PARA DETECÇÃO CANARY DE PATÓGENOS DE FASE FLUIDA DE ORIGEM SANGUÍNEA:

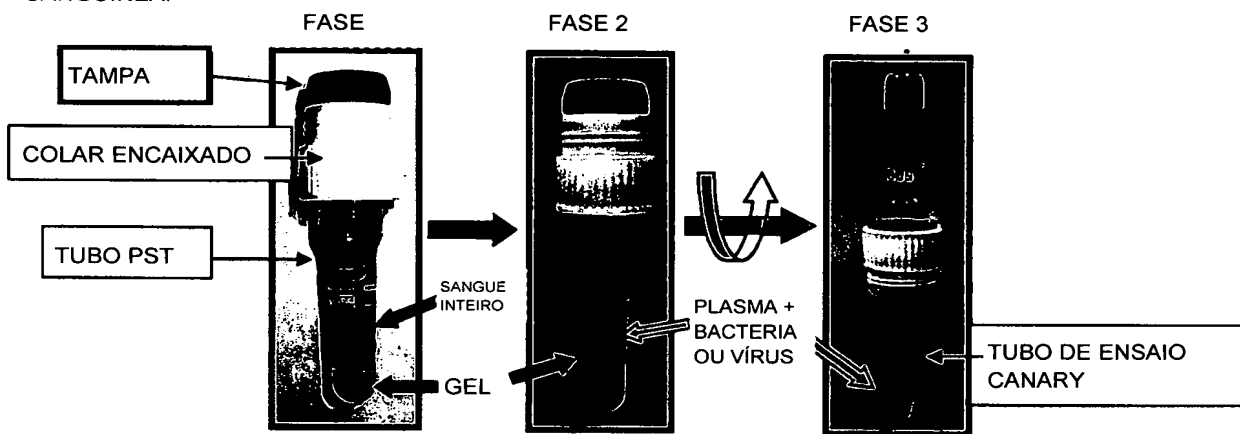
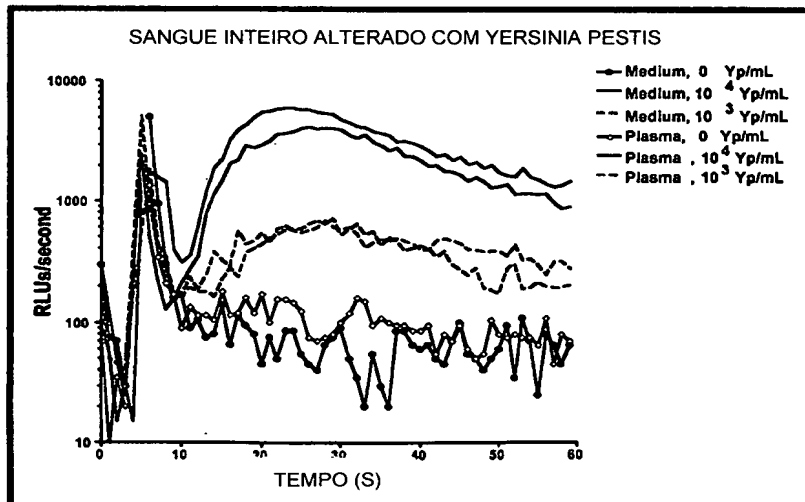
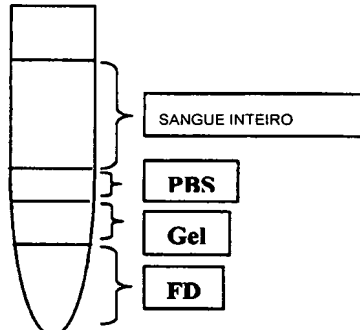


FIG. 103



79/135

APARELHO E PROTOCOLO PARA DETECÇÃO CANARY DE PATÓGENOS INTRACELULARES DE ORIGEM SANGUÍNEA



O DIAGRAMA A SEGUIR INDICA A POSIÇÃO DOS COMPONENTES PÓS-CENTRIFUGAÇÃO

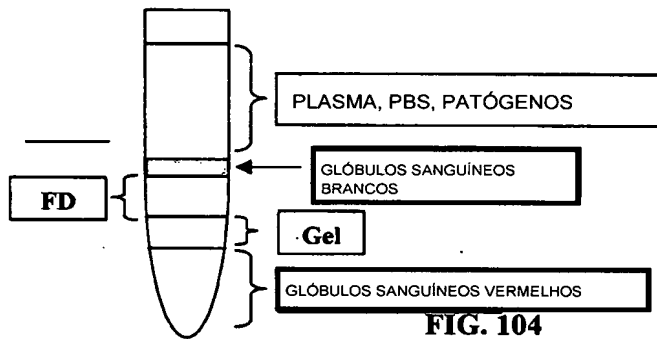


FIG. 104

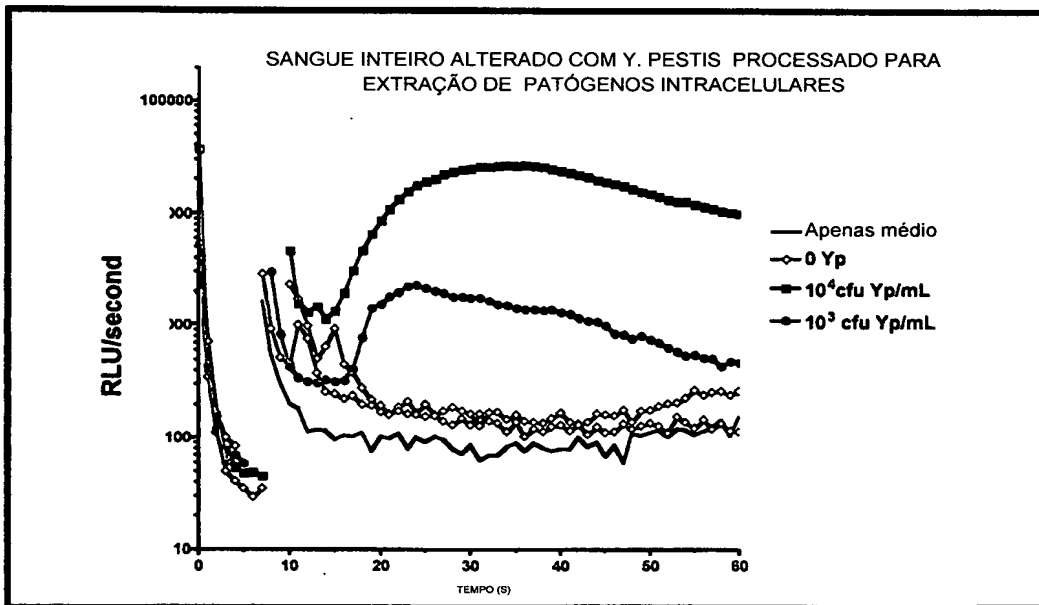
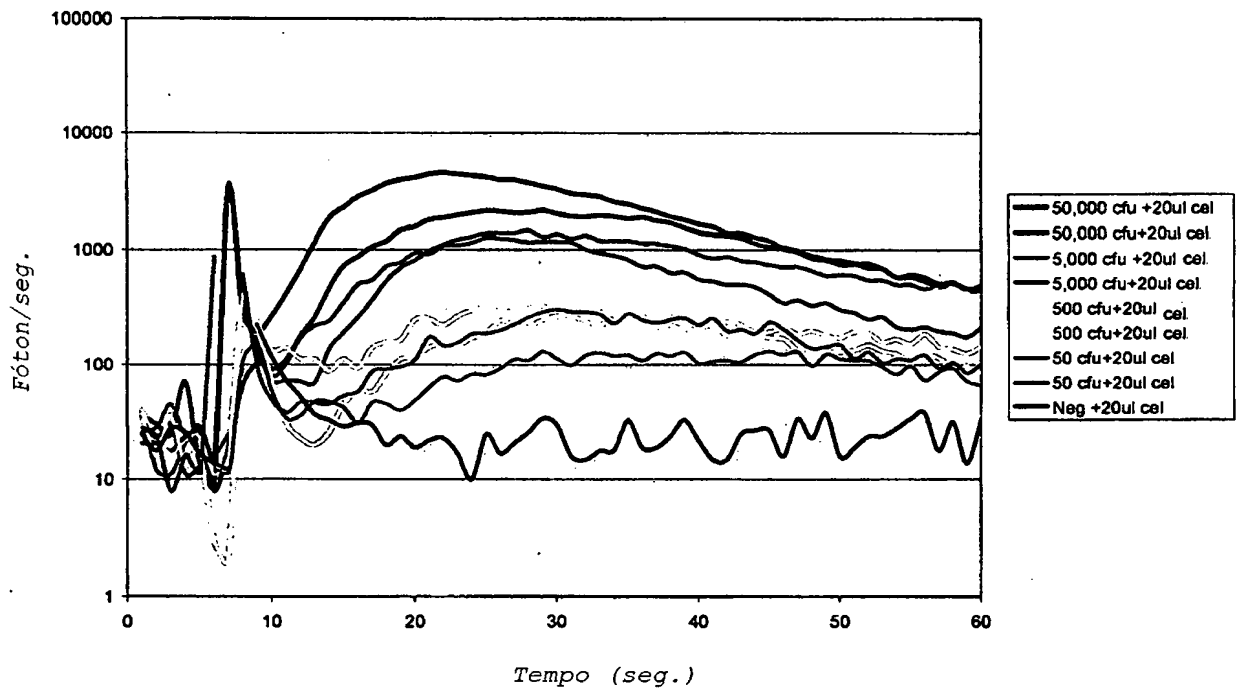


FIG. 105

O LIMITE PARA DETECÇÃO DE Y. PESTIS EM SANGUE INTEIRO ALTERADO É 1000 cfu/ML QUANDO A AMOSTRA DE SANGUE É PROCESSADA PELO MÉTODO DESCRITO ACIMA PARA OBTEN PATÓGENOS INTRACELULARES

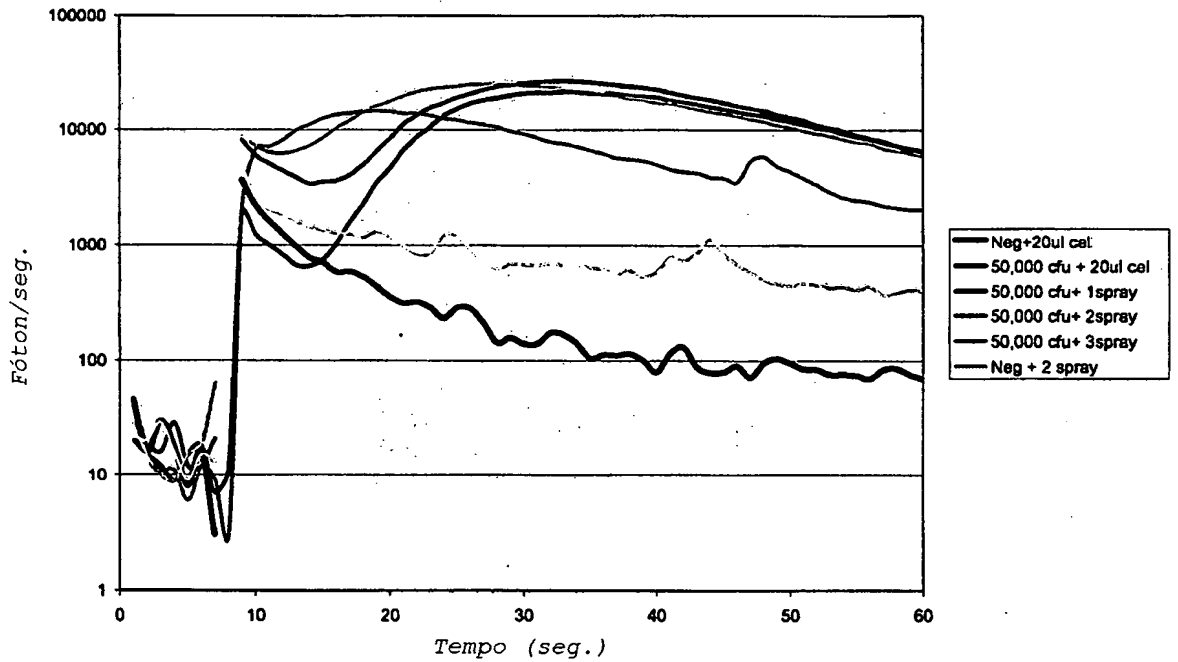
80/135

Padrão 062504 Ba  
Batelada BaDH4 6/22 4x(utilizada)



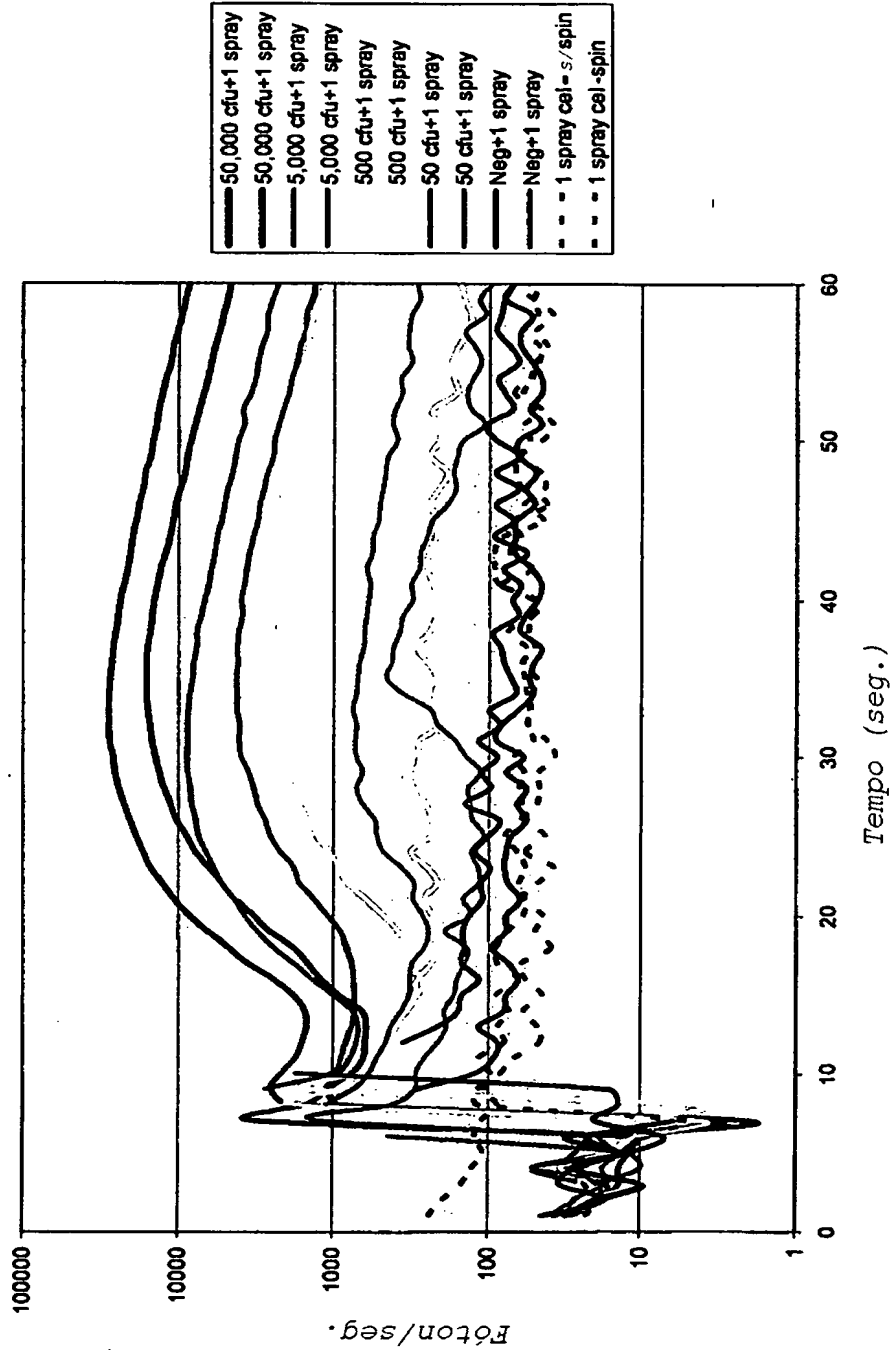
**FIG. 106. Estrutura Ba com saída de 20ul de células. 50ul de amostra de Ba preparada em CO2(l) medida e testada com 20ul de células B. Os resultados indicam baixos antecedentes e um LOD de 50 cfu Ba (n=2)**

Spray de Célula B 062504 Ba: Número de sprays necessários  
Batelada BaDH4 6/22 4x(utilizada)



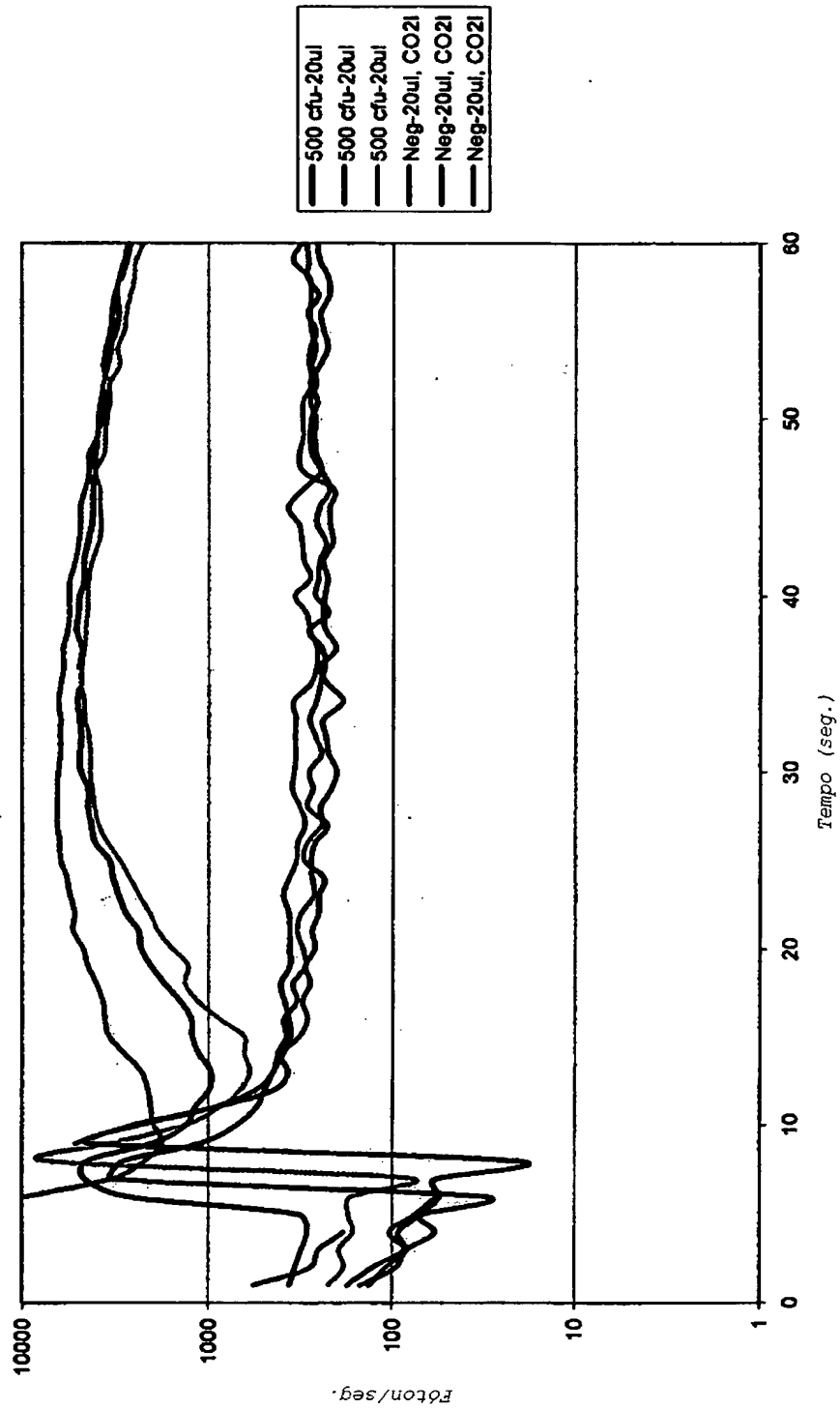
**FIG. 107. Pulverizador de células Ba B.** 50ul de amostra de Ba preparada em CO<sub>2</sub>(l) medida e testada com números variados de pulverizadores de células Blas B. Os resultados indicam um aumento de antecedentes com 2 pulverizadores comparados à saída de 20ul de células. O número de pulverizadores não afeta o pico de intensidade com 50,000 cfu Ba (n=1).

Spray de Célula B 062504 Ba  
Batejada BaDH4 6/22 4x(utilizada)



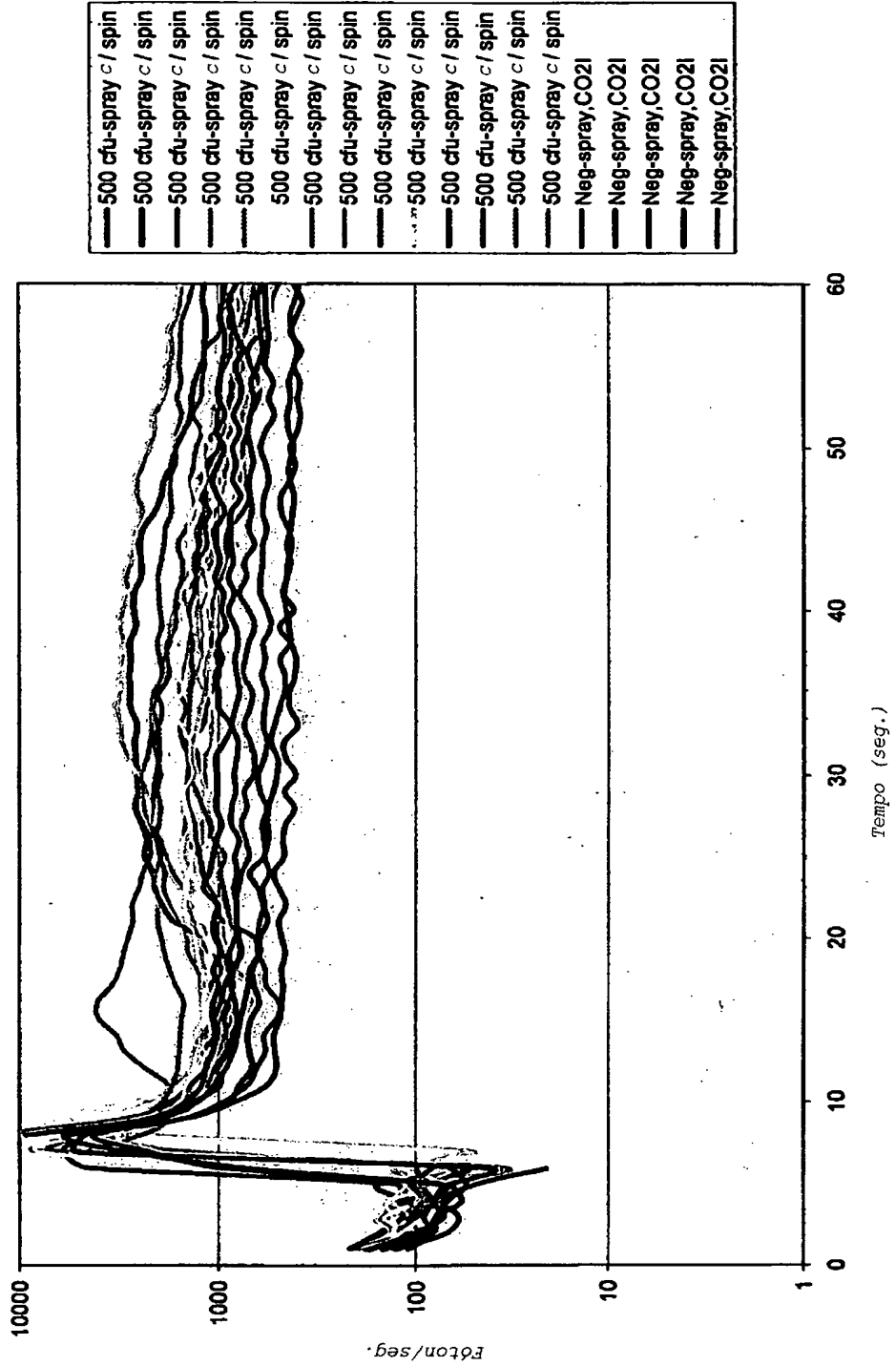
**FIG. 108. Estrutura Ba com um pulverizador de células de saída.** 50ul de amostra de Ba preparada em CO<sub>2</sub>(l) medida e testada com um pulverizador de células B. Os resultados indicam antecedentes similares com 20ul de saída de células e um LOD de 5,000 cfu. 50 e 500cfu Ba mostram 50 % de chance de detecção (n=2)

Padrão 063004 Ba: 500 cfu Ba  
 Batelada BaDH4 6/24 4x

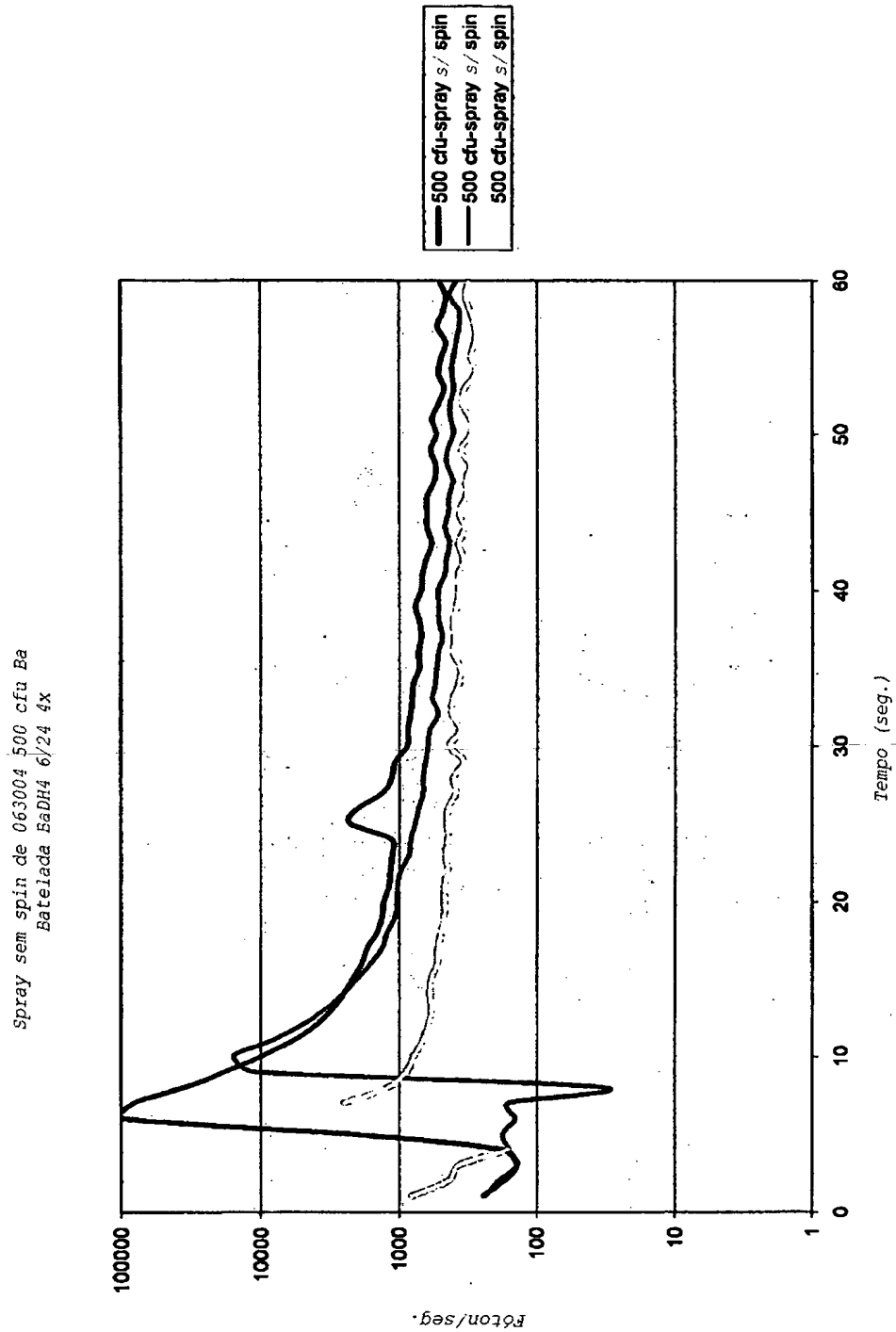


**FIG. 109. Estrutura Ba: detecção de 500cfu Ba com 20ul de células B.. 50ul de amostra de Ba com 500cfu Ba foi preparada em CO2(l) medida e testada com 20ul de células B. Os resultados indicam 100% de detecção de 500cfu mesmo com maiores antecedentes do que a normalidade (n=3).**

Spray de célula B 063004: detecção de 500cfu Ba  
 Bateria BaDH4 6/24 4X



**FIG. 110. Pulverizador de células Ba B: detecção de 500cfu Ba com 1 pulverizador de células B.** 50ul de amostra de Ba com 500cfu Ba foi preparada em CO2(l) medida e testada com um pulverizador de células B. Os resultados indicam 50% de detecção de 500cfu e antecedentes 2-3 vezes maiores (n=14).



**FIG. 111. Pulverizador de células Ba B: detecção de 500cfu Ba com 1 pulverizador de células B e sem giro.** 50ul de amostra de Ba com 500cfu Ba foi preparada em CO<sub>2</sub>(l) medida e testada com um pulverizador de células B. As amostras não foram giradas por 5 segundos antes da leitura. Os resultados indicam nenhuma célula de interação com o agente resultando em 0% de detecção de 500cfu Ba (n=3).

Padrão 070104 Yp: 500cfu Yp  
 Batelada Yp 24-6 7/1 4x Nova

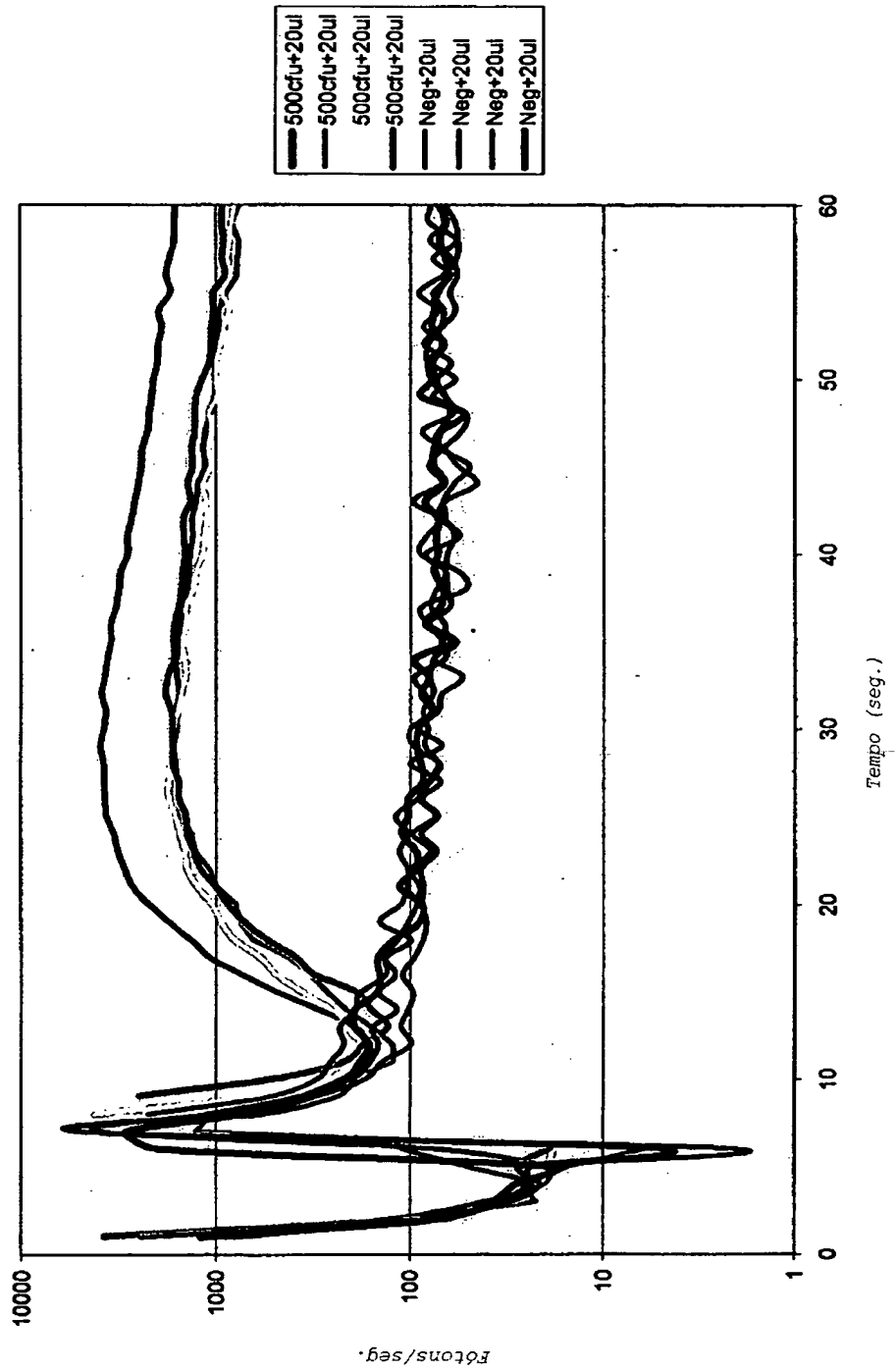
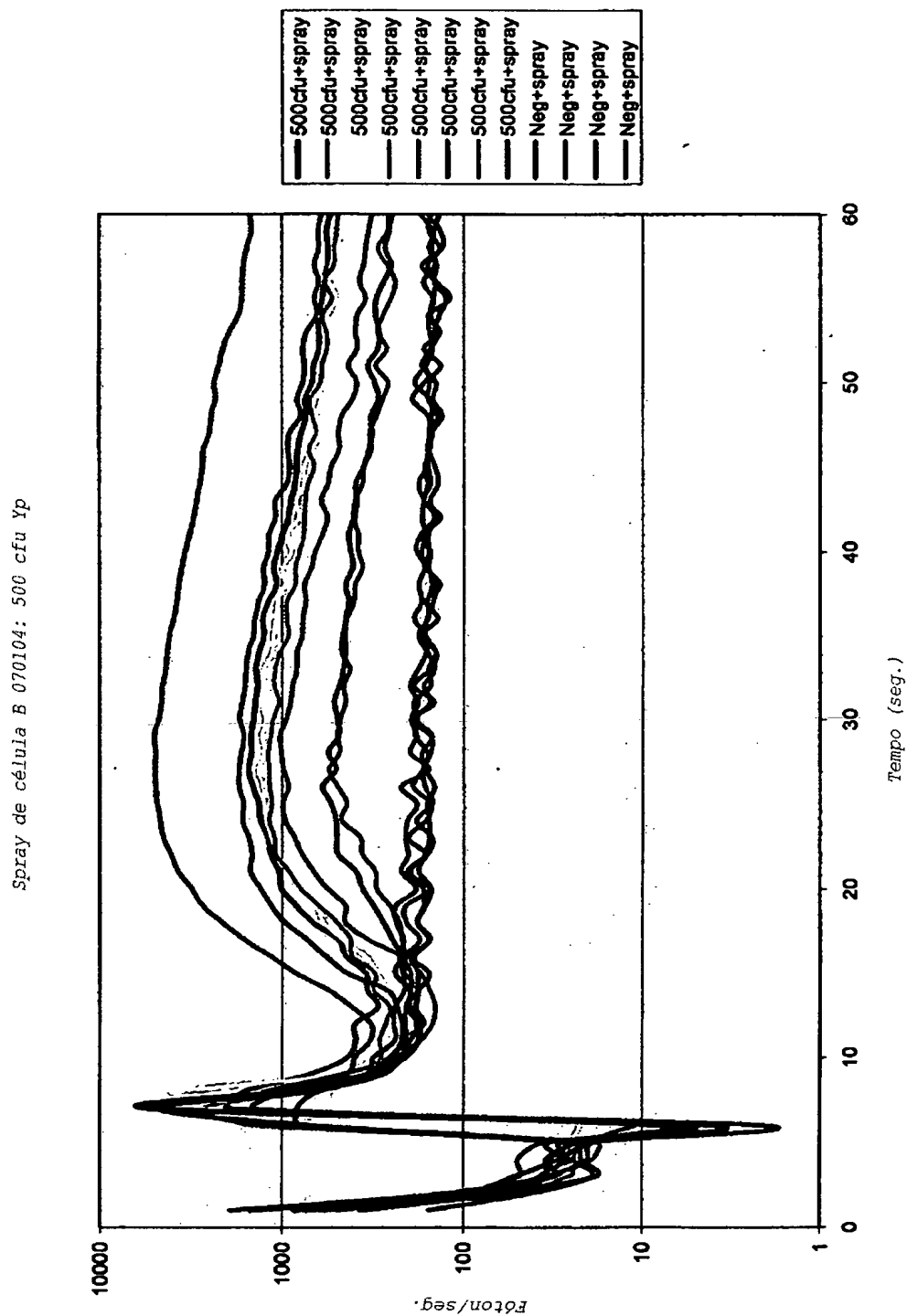
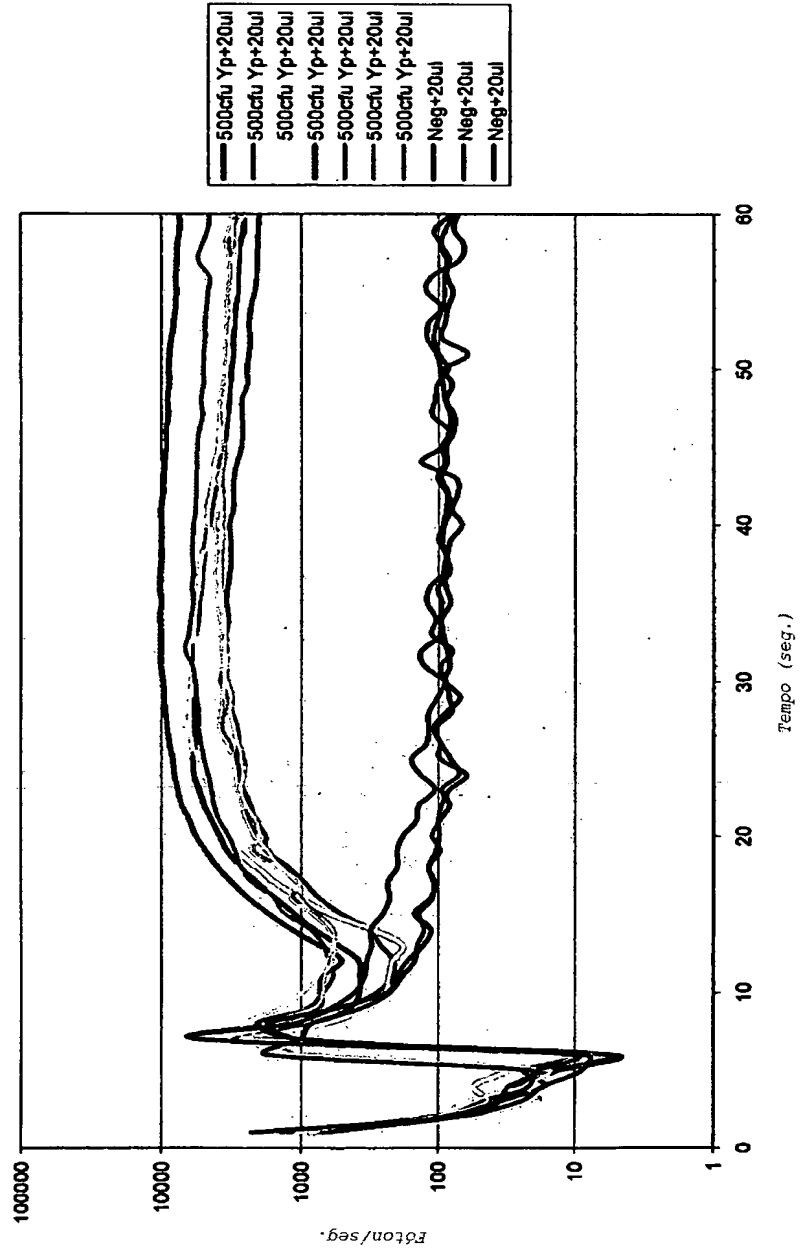


FIG. 112. Pulverizador de células Yp B: detecção de 500cfu Yp com 20ul de células B. 50ul de amostra de Yp com 500cfu Yp foi preparada em CO<sub>2</sub>(l) medida e testada com 20ul de células B. . Os resultados indicam antecedentes típicos e 100% de detecção de 500cfu Yp (n=4).



**FIG. 113. Pulverizador de células Yp B: detecção de 500cfu Yp com um pulverizador de células B.** 50ul de amostra de Yp com 500cfu Yp foi preparada em CO<sub>2</sub>(l) medida e testada com um pulverizador de células B. . Os resultados indicam um pequeno aumento de antecedentes com 100% de detecção de 500cfu Yp (n=8).

Padrão 070204 Yp: 500 cfu Yp  
 Bateria Yp24-6 063004 4x Nova



**FIG. 114. Estrutura Yp: detecção de 500cfu Ba com um 20ul de células B.** 50ul de amostra de Yp com 500cfu Yp foi preparada em CO<sub>2</sub>(l) medida e testada com 20ul de células B. Os resultados indicam 100% de detecção de 500cfu com antecedentes típicos (n=7).

070204 500cfu Yp seco + 20ul de células B  
 Batejada Yp24-6 063004 4x Nova

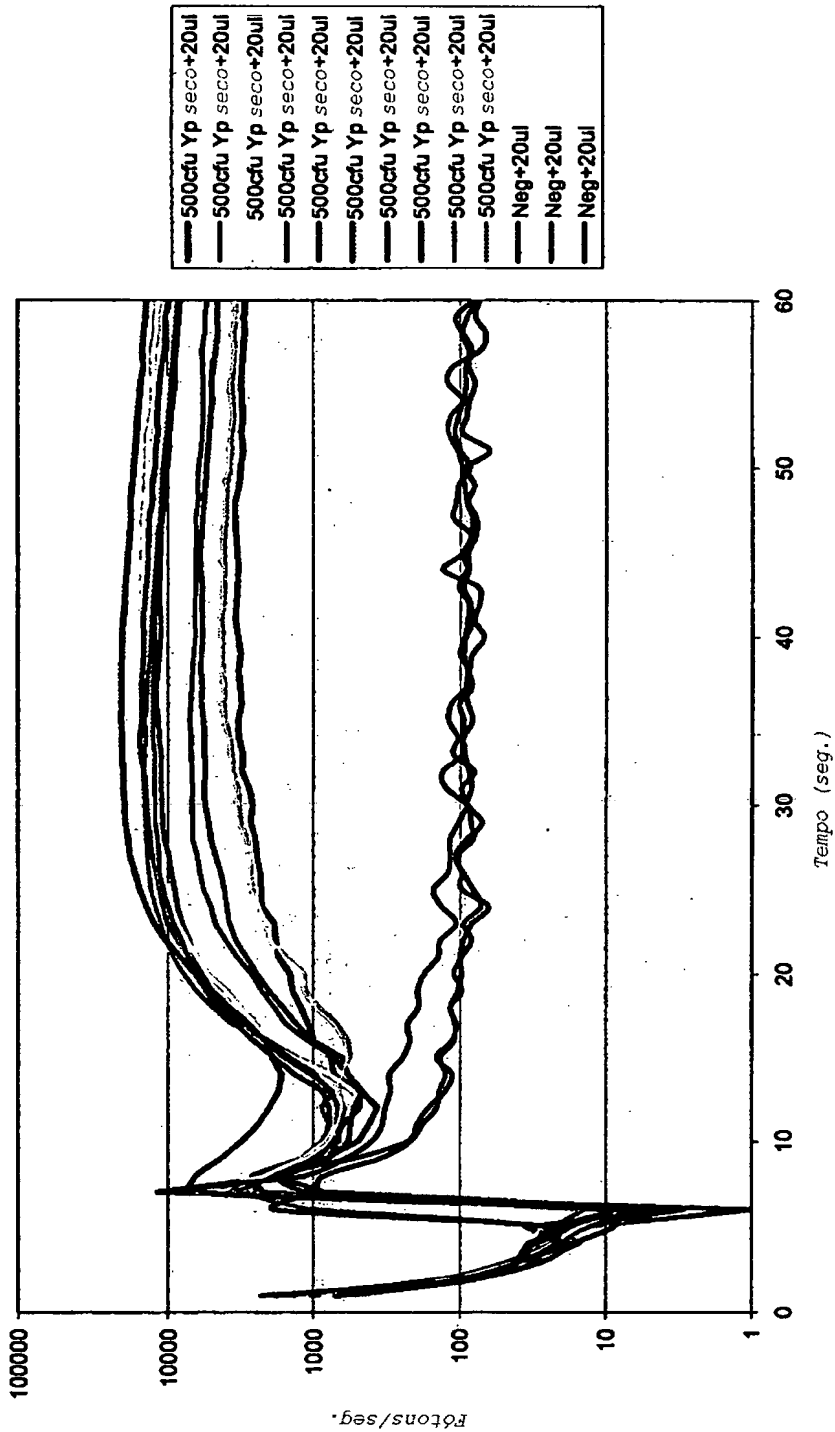
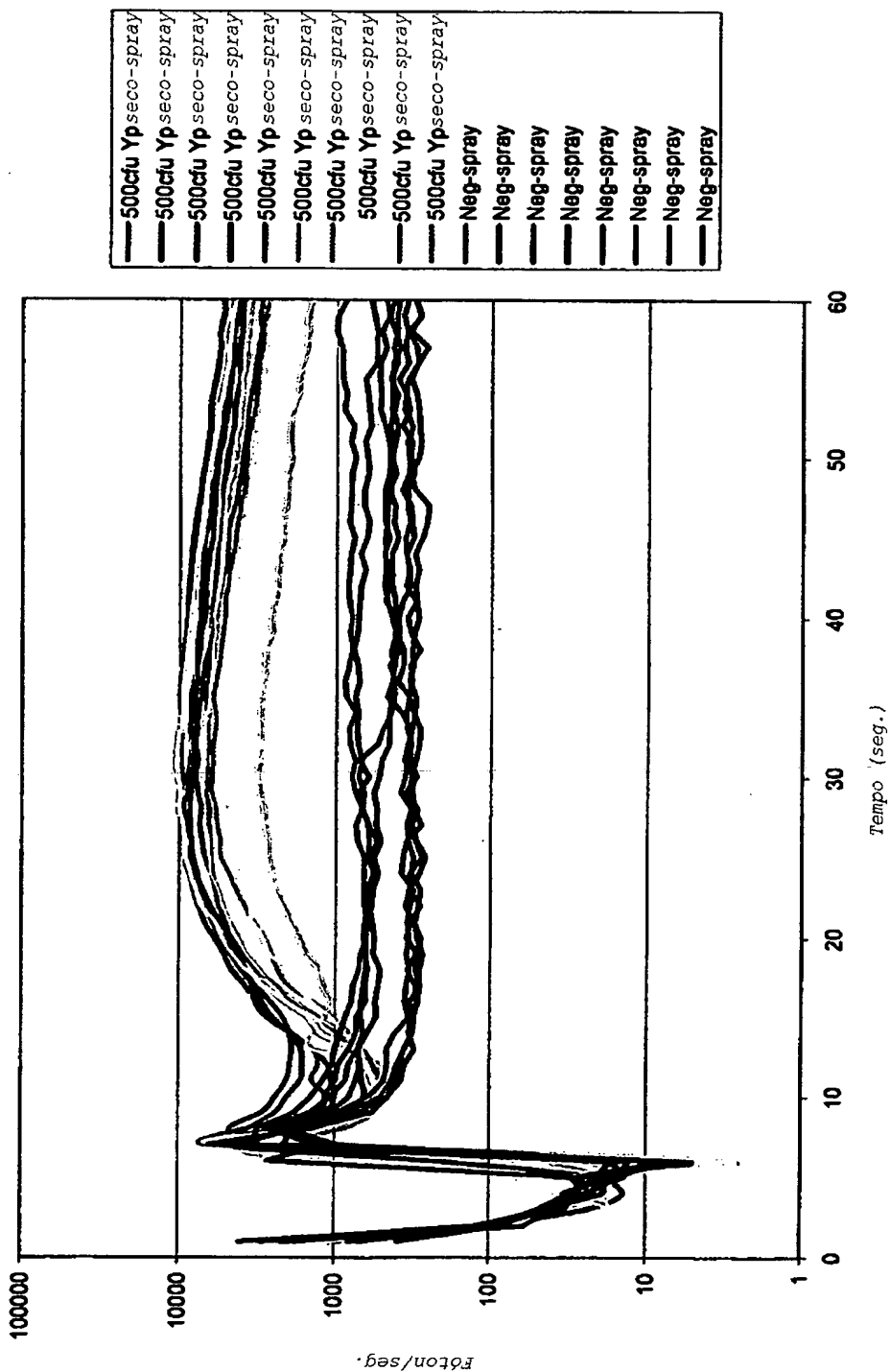


FIG. 115. Pulverizador de células Yp B: detecção de 500cfu Yp secas com um 20ul de células B. 5ul de amostra de Yp com 500cfu Yp foi preparada em dH<sub>2</sub>O, secadas durante a noite, e testadas com 20ul de células B. Os resultados indicam 100% de detecção de 500cfu Yp (n=10).

Spray de célula B 070204: 500cfu Yp seco  
 Bateria Yp24-6 063004 4x Nova



**FIG. 116. Pulverizador de células Yp B: detecção de 500cfu Yp secas com um pulverizador de células B.** 5ul de amostra de Yp com 500cfu Yp foi preparada em dH<sub>2</sub>O, secadas durante a noite, e testadas com um pulverizador de células B. Os resultados indicam fundamentos maiores, mas 100% de detecção de 500cfu Yp (n=10).

91/135

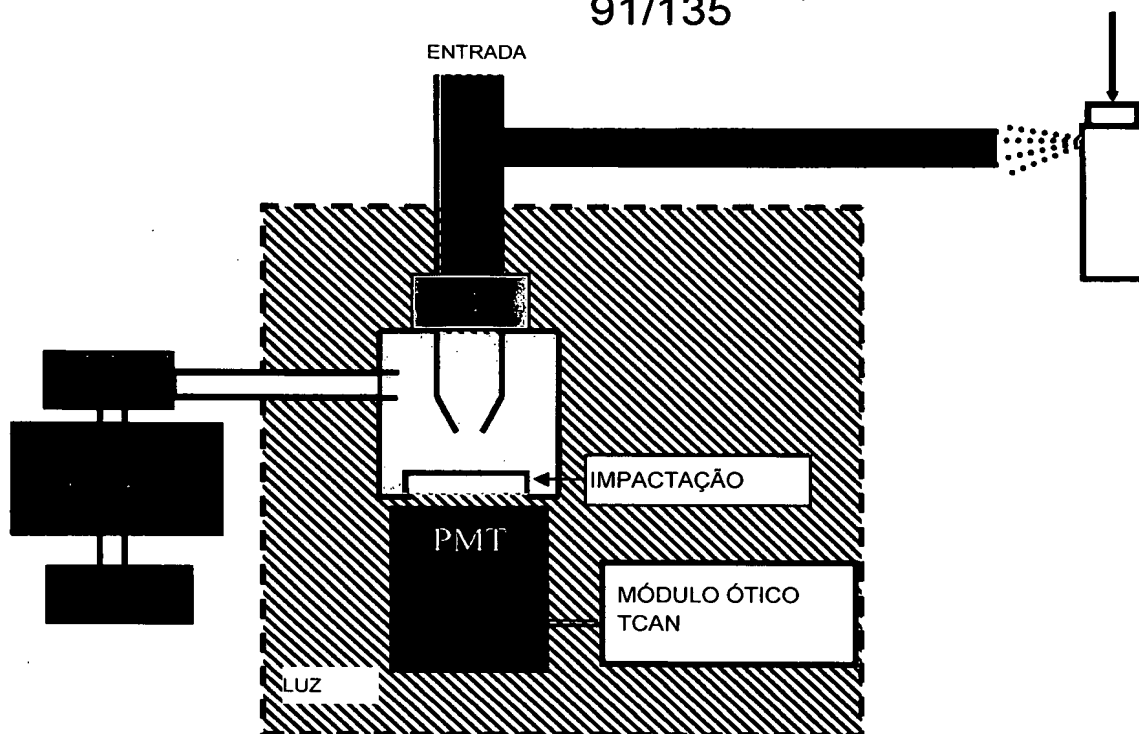


FIG. 117. PROCEDIMENTO PARA EXPERIENCIA DE IMPACTAÇÃO DE CÉLULA B

92/135

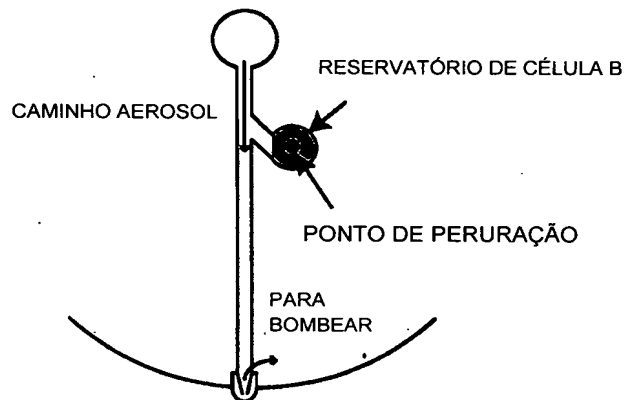


FIG. 118 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TÉCNICA 4

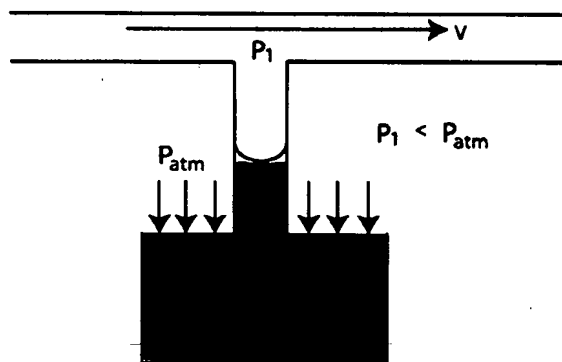


FIG. 119. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TÉCNICA 4

LEI DO GAS IDEAL

$$PV = nRT$$

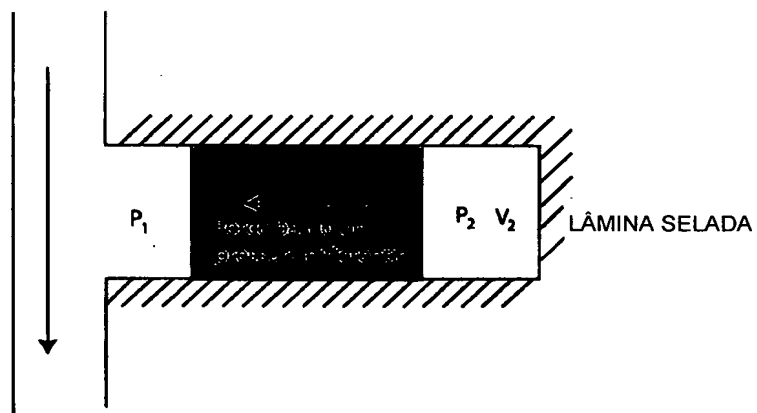
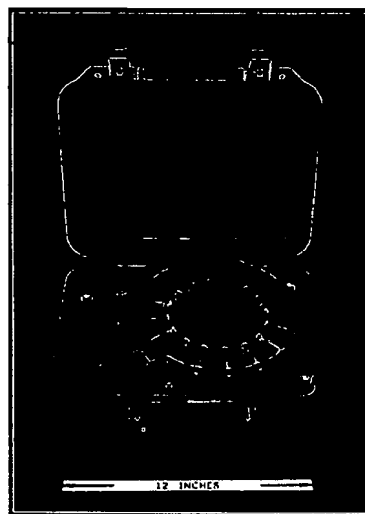
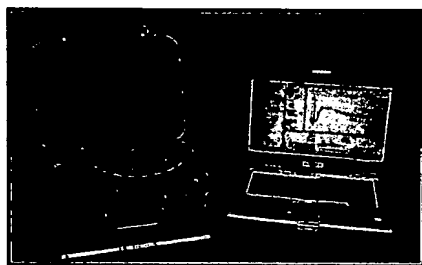


FIG. 120. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TÉCNICA 4



- \* MONITORA 16 AMOSTRAS COM UM PMT
- \* A SENSIBILIDADE COMBINA SENSORES DE CANAL-ÚNICO
- \* EQUIPAMENTO REFINADO PARA USO EM CAMPO
  - CENTRÍFUGAS SEPARADAS ELIMINADAS
  - ADAPTADO PARA ENERGIA POR BATERIAS
- \* PASSAGEM DE AMOSTRA AUMENTADA
  - ESTIMATIVA DE 100 AMOSTRAS POR HORA

FIG. 121. SENSOR PORTÁTIL DE 16 CANAIS

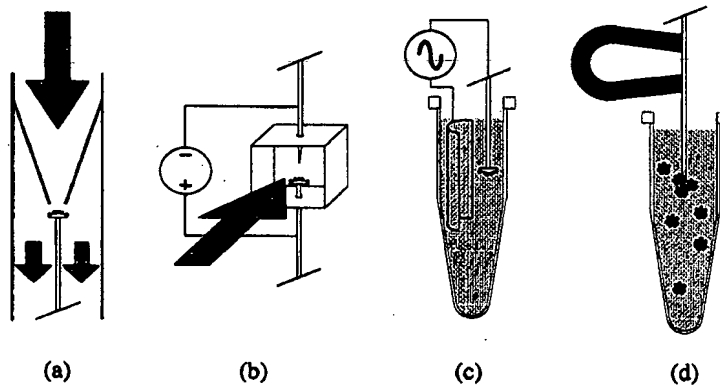


FIG. 122

94/135

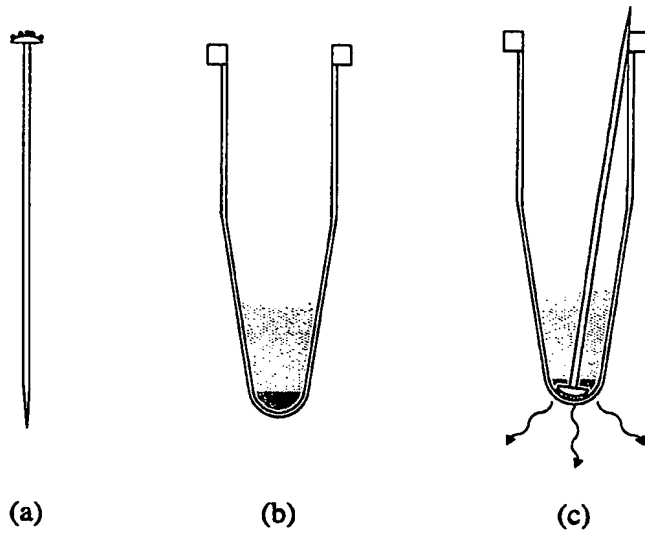


FIG. 123

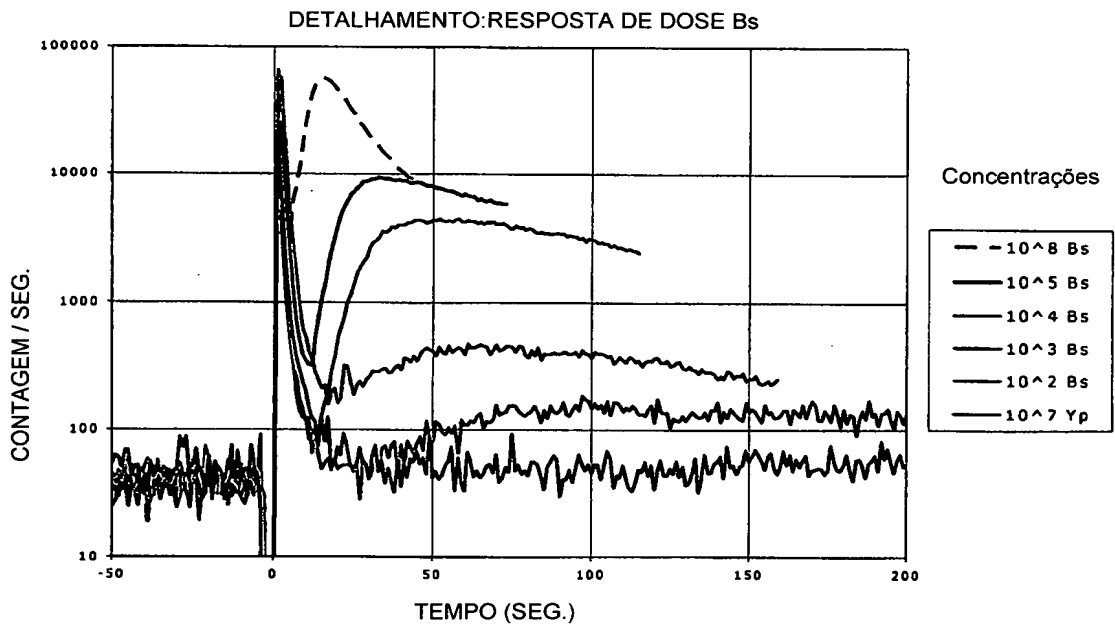


FIG. 124

95/135

DETALHAMENTO: COLEÇÃO ELETROSTÁTICA

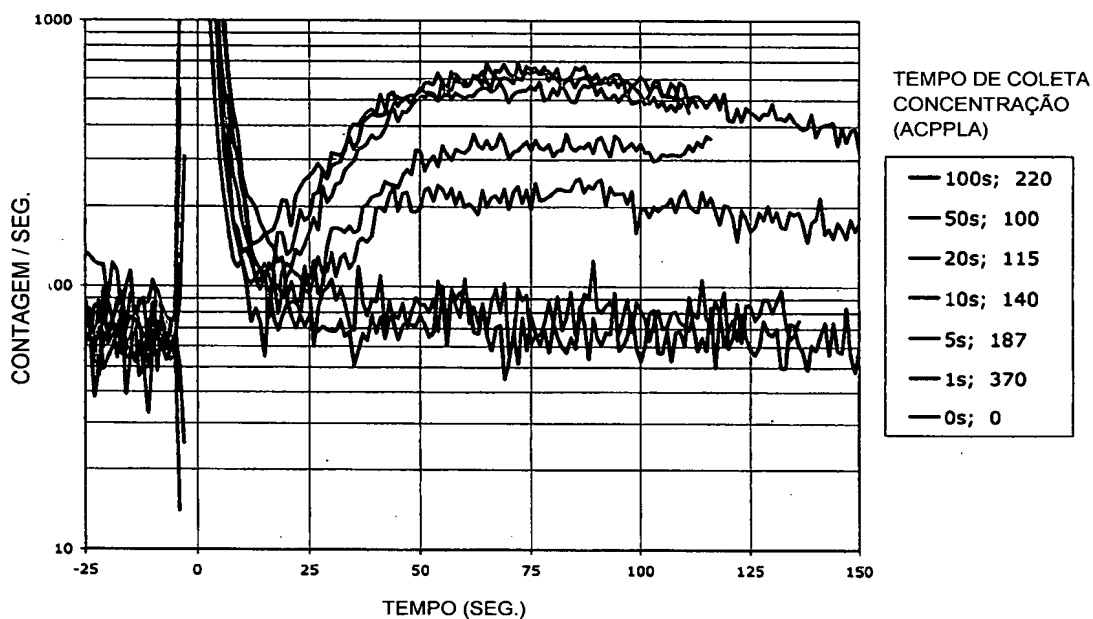


FIG. 125

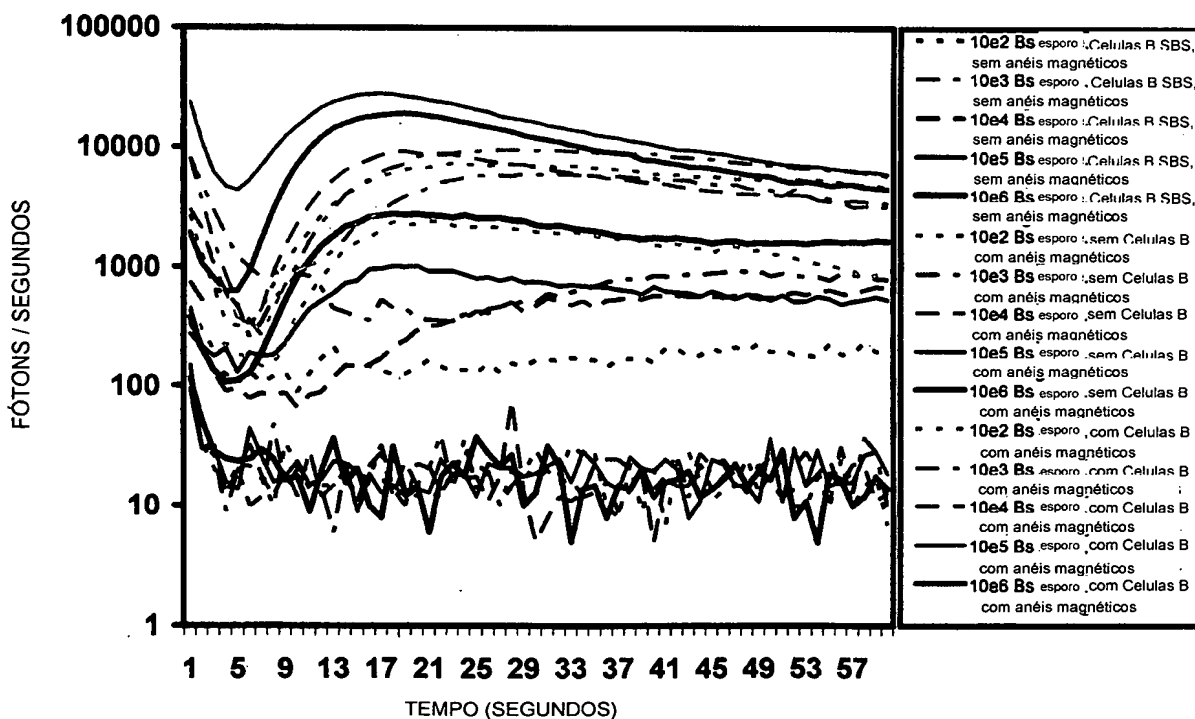


FIG. 126

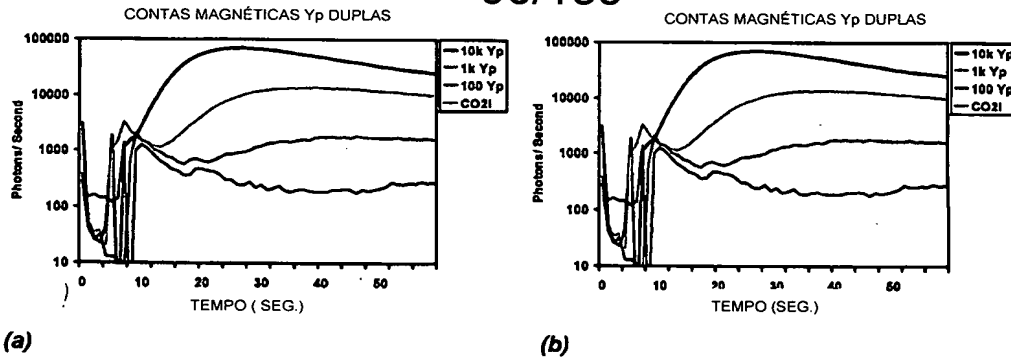
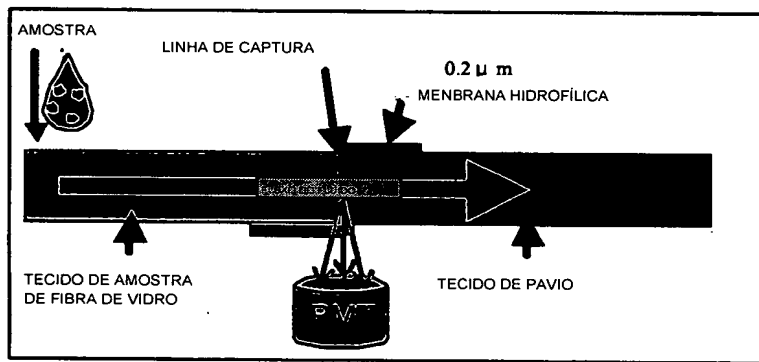
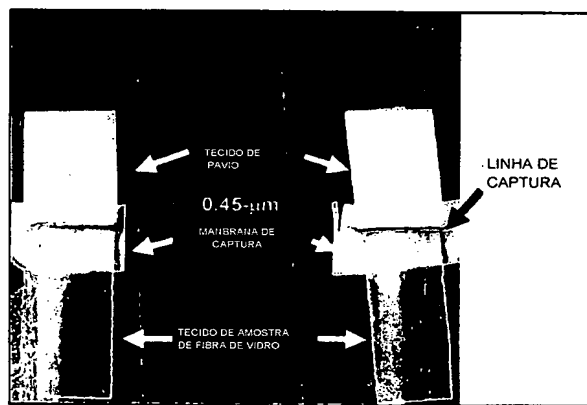


FIG. 127



VISTA LATERAL

FIG. 128



VISTA DE TOPO

FIG. 129

97/135

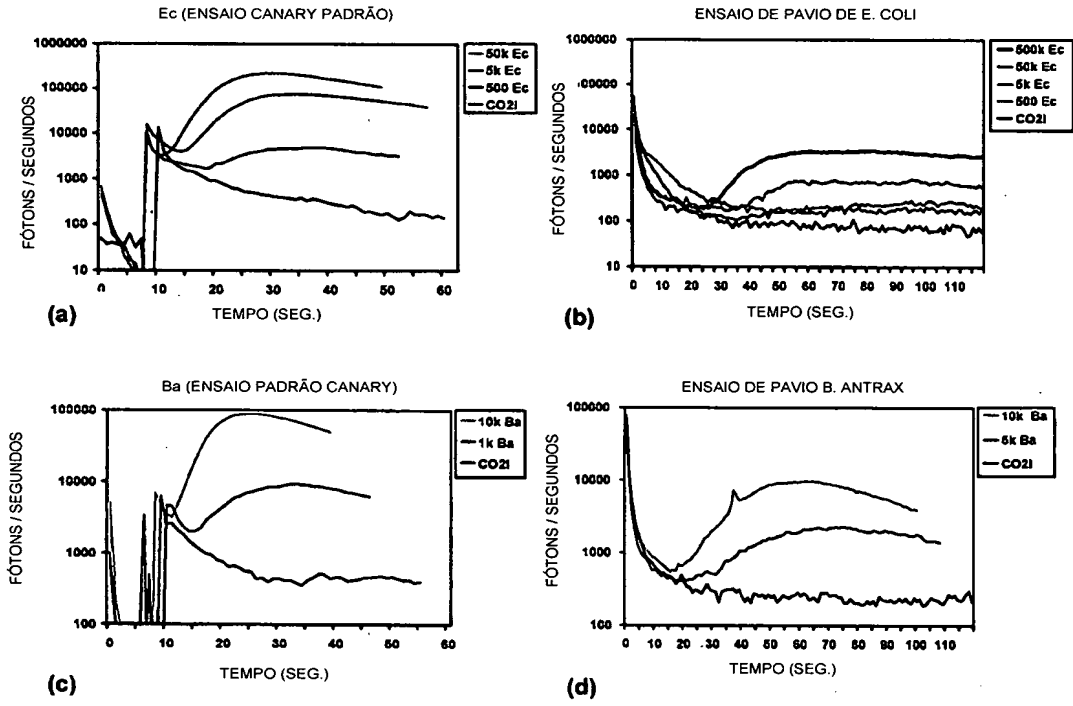


FIG. 130



FIGURA 131. SENSOR BIOAERESSOL AUTOMÁTICO CANARY

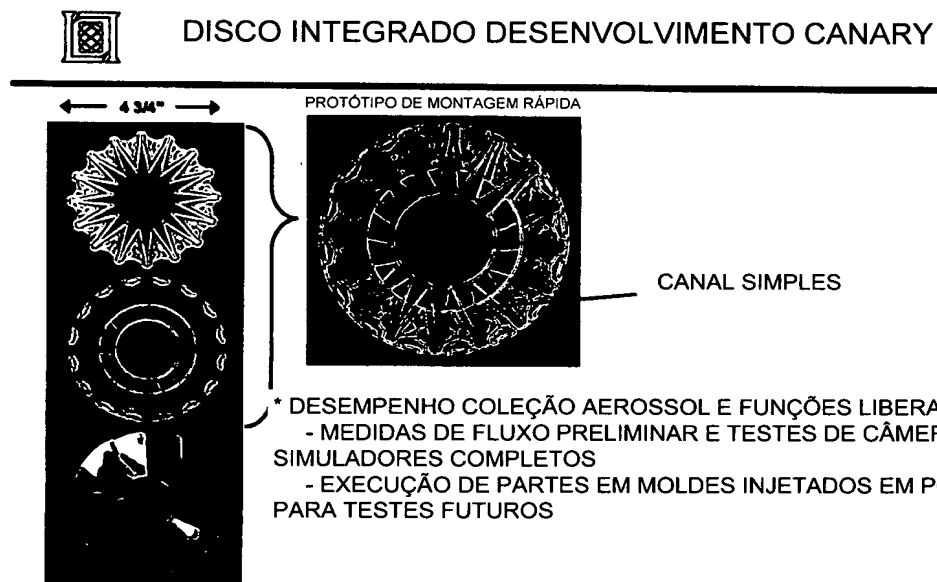


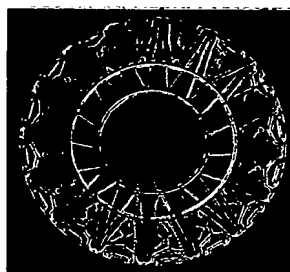
FIGURA 132. DISCO SENSOR BIOAERESSOL AUTOMÁTICO CANARY EXECUTA COLEÇÃO AEROSSOL E ESTOCA CÉLULAS -B CANARY E FUNÇÕES DE ENTREGA



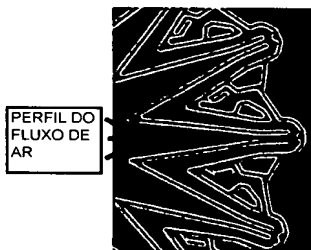
CARACTERÍSTICAS DA COLEÇÃO AEROSSOL

- ALVO PARA ELIMINAR NECESSIDADE PARA O CONCENTRADOR PELO AUMENTO DO VOLUME DE AMOSTRA - SE 10 ACPLA, 1 MIN. DE AMOSTRAGEM A 25 Lpm COM 50% DE EFICIÊNCIA
- FLUXO DE AR > 25 Lpm/CANAL MEDIDO USANDO 250 W DE SOPRO

PROTÓTIPO DE MINTAGEM RÁPIDA



SAÍDAS DE AR  
ENTRADA DE AEROSSOL



PARTÍCULA-REDUZIDA  
SAÍDA DE AR

FIGURA 133. DETALHES DA COLEÇÃO AEROSSOL DO DISCO SENSOR AEROSSOL AUTOMÁTICO CANARY

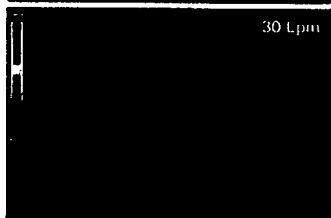


OTIMIZAÇÃO DA COLEÇÃO AEROSSOL

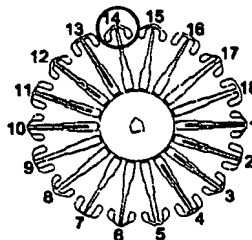
MODELAÇÃO DA GEOMETRIA DE IMPACTAÇÃO



3 Lpm



30 Lpm



DEPÓSITO DE  
PARTÍCULAS  
FLUORESCENTES  
DE 1 μm NAS  
RANHURAS

1 μm PARTÍCULAS, PERFIL #14

FIGURA 134. OTIMIZAÇÃO DA COLEÇÃO AEROSSOL DO DISCO SENSOR BIOAEROSSOL AUTOMÁTICO CANARY



REGIÃO DE LIBERAÇÃO DE CÉLULAS- MATERIALIZAÇÃO EM PLUG VISCOSO

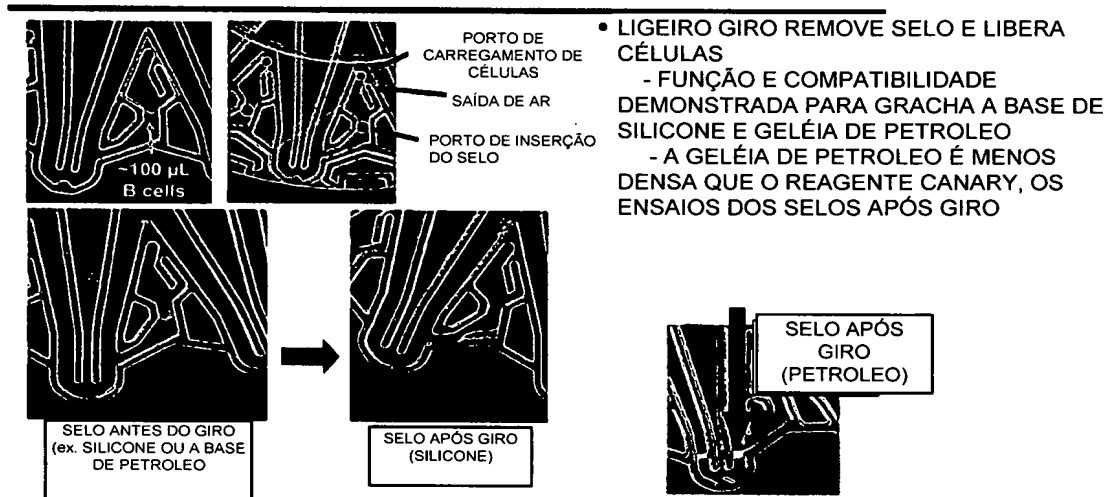


FIGURA 135.

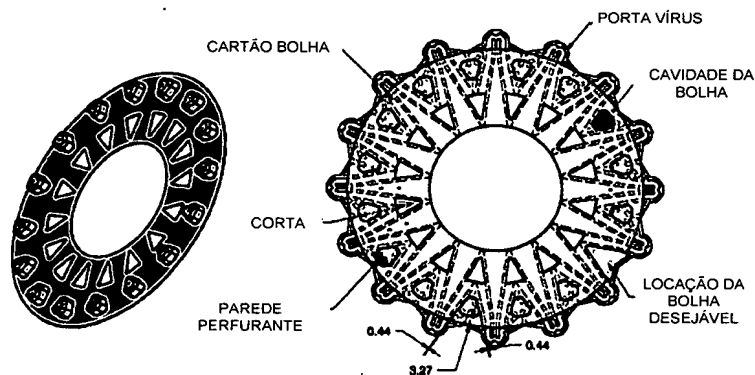


FIGURA 136.

101/135

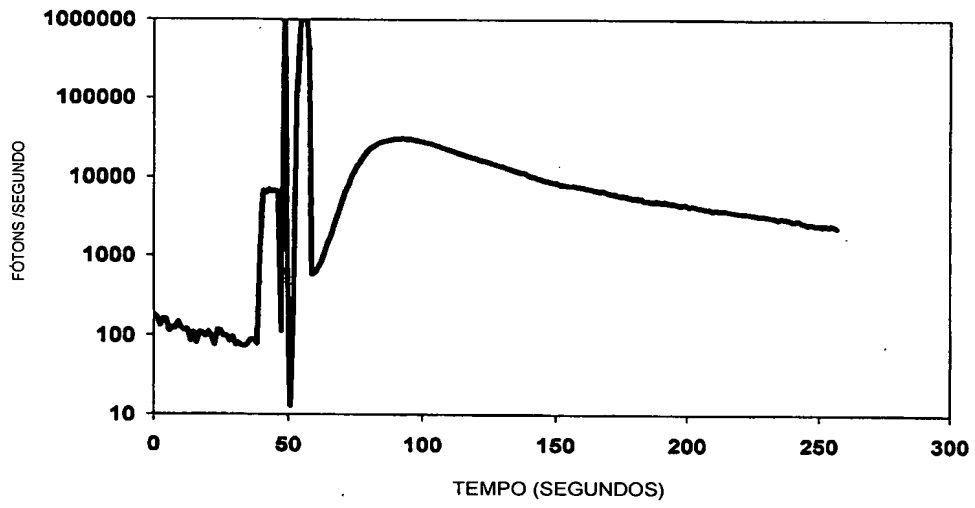
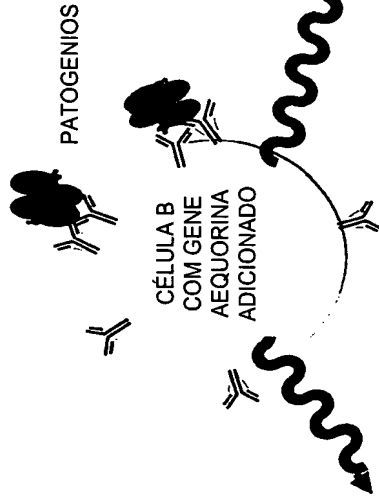


FIG. 137

## TECNOLOGIA DO IDENTIFICADOR CANARY

(1) ANTICORPOS DELIGAÇÕES CRUZADAS PATOGENÍCAS



- RESPOSTA EM SEGUNDOS

- ALTA SENSIBILIDADE

- A ESPECIFICAÇÃO DA CÉLULA B É ELABORADA COM ANTICORPOS RECOMBINADOS

- AEQUORINA AMPLIFICA SINAL E FORNECE INTERFACE SIMPLES

(2) AMPLIFICAÇÃO DO SINAL BIOQUÍMICO LIBERA  $Ca^{2+}$

(3)  $Ca^{2+}$  AEQUORINA EMITIR FOTONS

(4) DETECTA FOTONS

102/135

### ESCOPO DO ENSAIO

#### SUBSTÂNCIAS DETECTÁVEIS

- BACTÉRIAS
- VIRUS
- SEQUÊNCIAS DNA/RNA
- TÓXINAS
- BIOREGULADORES?

#### \* APLICAÇÕES

- CAMPO BIOAGENTE ID
- ALIMENTOS/TESTES AGRICULAS
- ENSAIOS DE DIAGNÓSTICOS MÉDICOS
- MONITORAÇÃO DE BIORESSOL

RIDER TH, E OUTROS., SCIENCE, 301:213,2003

FIG. 138

## STATUS DE LINHAS CÉLULA- B\*

PODEM SER DETECTADAS	TÓXINA BOTOLINICA
ESPOROS, BACILLUS ANTHRACIS	SALMONELLA SPP.
BACILLUS ANTHRACIS, 2 PARA VEGETAIS	SHIGELLA DYSENTERIAE
FRANCISELLA TULARENSIS	E. COLI O157:H7
YERSINIA PESTIS	FMD VIRUS
VIBRIO CHOLERAEE (DESCENDÊNCIA O139 E O1)	VEE VIRUS
BRUCELLA SPP.	DENGUE VIRUS
CHLEMYDIA SPP.	ORTHOPOXVIRUSES (VARIÓLA)
BACILLUS SUTILIS SPOROS (PARA USO COMO SIMULADOR)	RALSTONIA SPP.
SEQÜÊNCIAS DNA/RNA	POTYVIRUS
	HIBRIDOMAS, SEQÜÊNCIAS ANTICORPOS E AGENTES INATIVOS
EM DESENVOLVIMENTO	FORNECIDOS POR: NMRC;
RICIN	USAMRIID; ATCC; BORSTEL
SEB	CENTRO DE PESQUISAS; ALEMANHA;
PHYTOPHTHORA SPP.	CDC-FT. COLLINS; DPG; JOHN KEARNEY.
	USDA-ARS; E US ARMY-NATICK

\*CDC/USDA "LISTAS A E B"

103/135

FIGURA 139

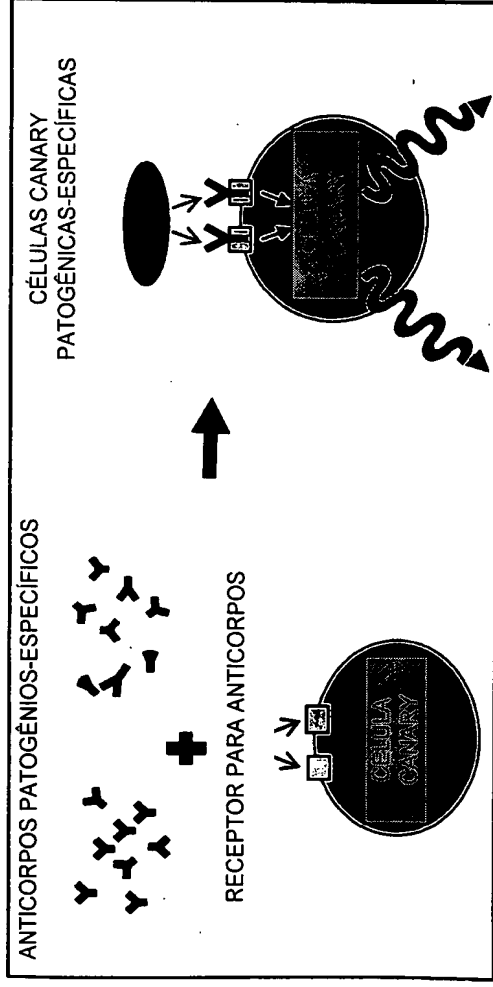
## CELILAS CANARY UNIVERSAL

### PARA ENFERMIDADES EMERGENTES

**OBJETIVOS:** UMA LINHA DE CÉLULA UNIVERSAL PODE SER OBTIDA PARA GERAR NOVAS CÉLULAS PATOGENICAS-ESPECIFICAS EM <1 DIA (VS. 2-3 MESES DE ENGENHARIA GENÉTICA)

### ACESSO:

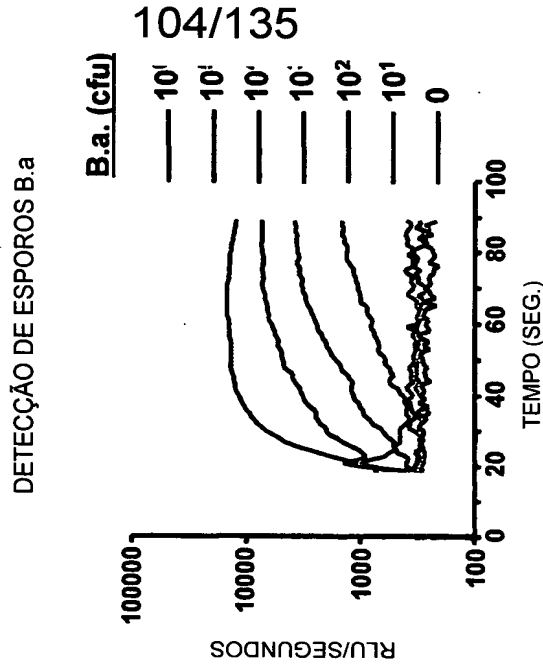
CRIAR UMA LINHA QUE EXPRESSA AEQUORINA E UM ANTICORPO RECEPTOR GENERALIZADO



### REALIZAÇÕES:

\*GERAÇÃO RÁPIDA(< 10 min) DE CÉLULAS PATOGENICAS-ESPECIFICAS

\*FLEXÍVEL: PODE ACEITAR ANTICORPOS MONOCLONAIS E POLICLONAIS  
DETECÇÃO ESPECÍFICA; TRABALHA PARA OTIMIZAR SENSIVIDADE



**FIG. 140**

OPERAÇÃO DE ENSAIO CANARY

105/135

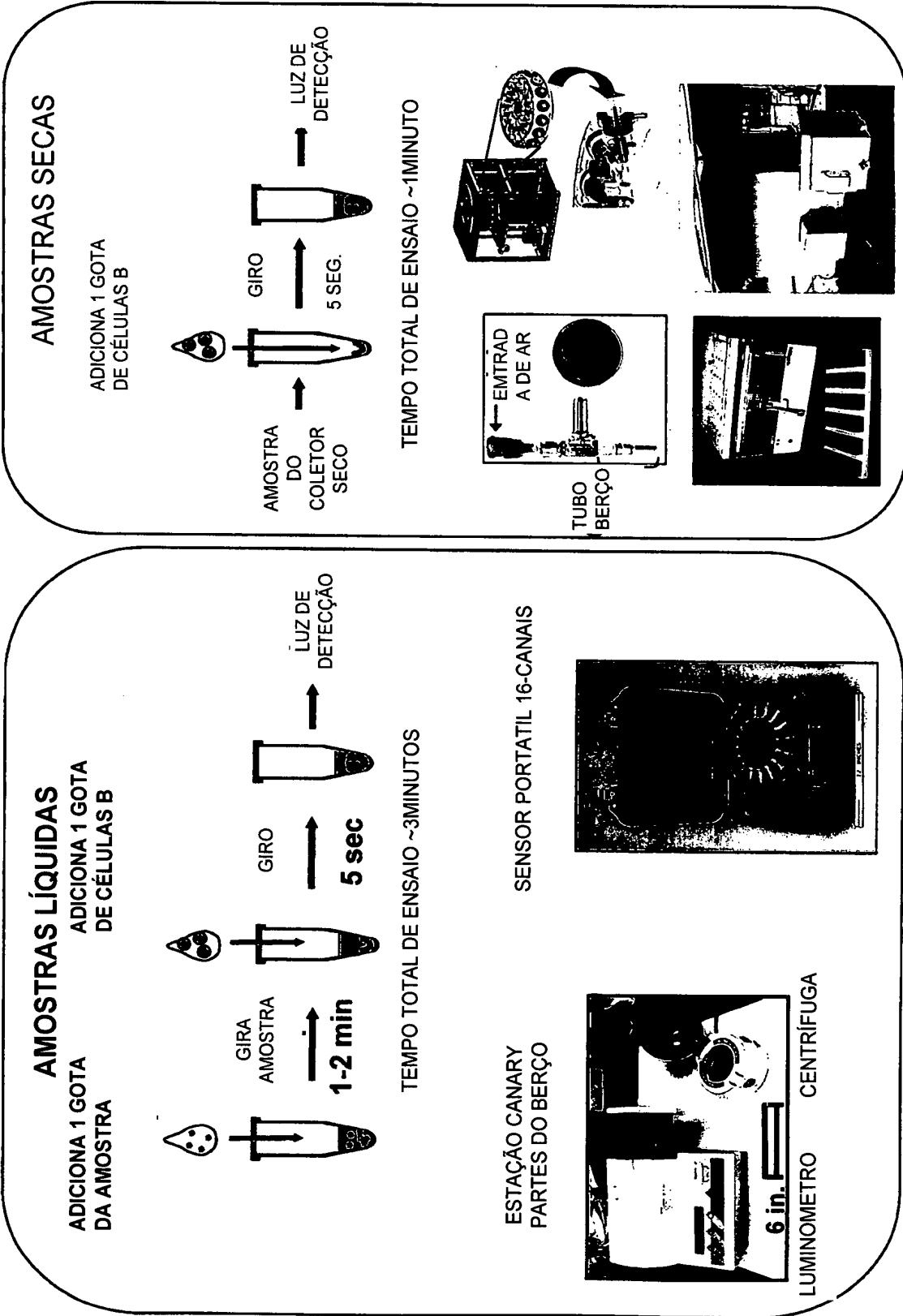
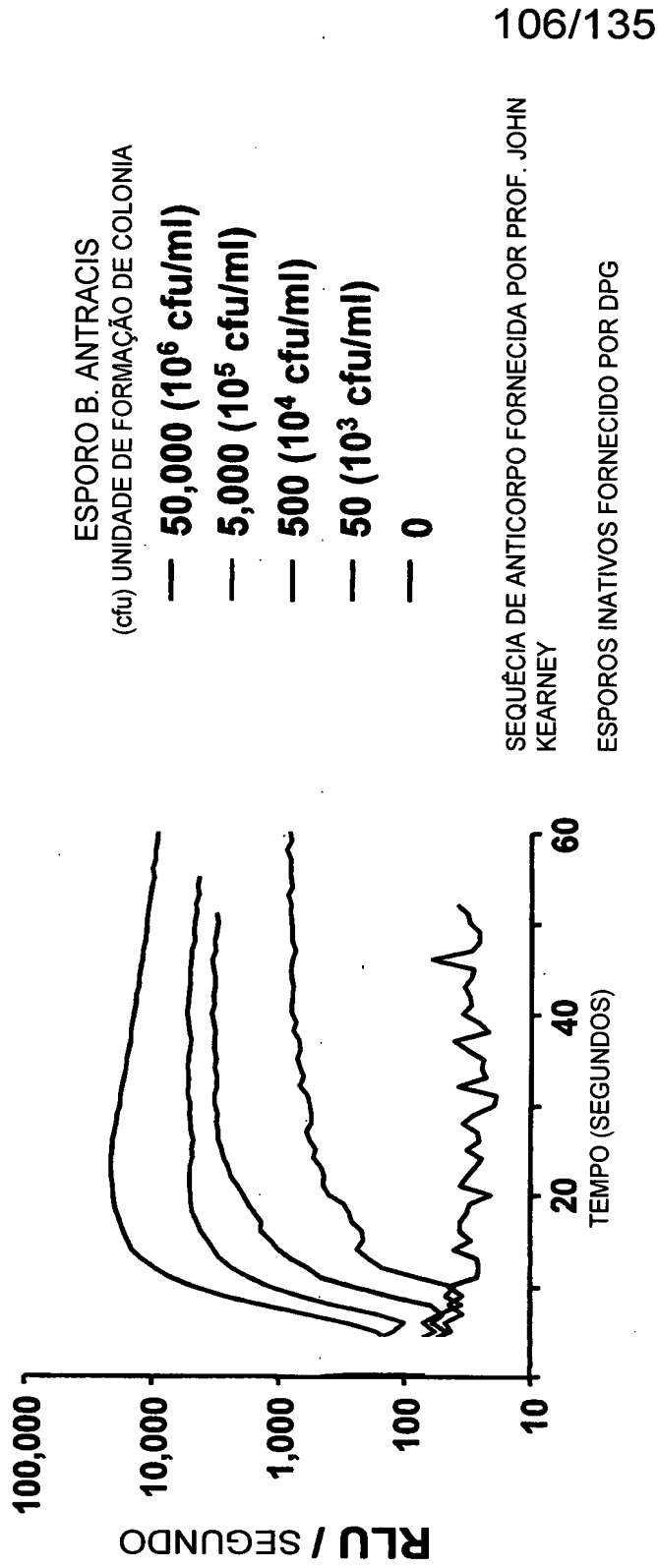


FIG. 141

IDENTIFICAÇÃO CANARY NO LÍQUIDO

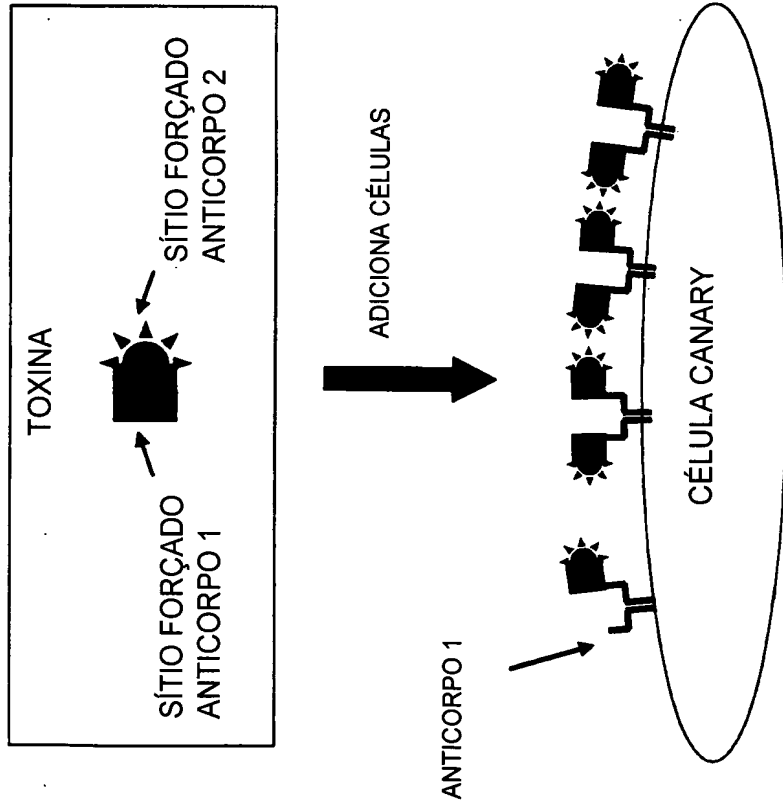


- MELHOR COMBINAÇÃO DE VELOCIDADE E SENSIVIDADE PARA IDENTIFICAÇÃO PATOGENICA ( $\leq 50$  PARTÍCULAS EM  $< 3$  MIN. INCLUINDO PRE GIRO)
- SENSIVIDADE É COMPARÁVEL PARA OUTRAS BACTÉRIAS E PARA GRANDES VÍRUS TESTADOS INCLUINDO Y. PESTIS E VÍRUS VACINA (DESCENDÊNCIA DE VACÍOLA)

FIG. 142

DETECCÃO DE TOXINA USANDO CANARY

DESAFIO: TOXINAS PROTEÍICAS PODEM SER MONOMÉRICAS AS QUAIS PODEM FALHAR PARA ESTIMULAR CÉLULAS CANARY



ESTRATÉGIA: PRENDER TOXINAS NO BERÇO E ENTÃO USE CANARY PARA DETECTAR TOXINA DECORADAS NO BERÇO

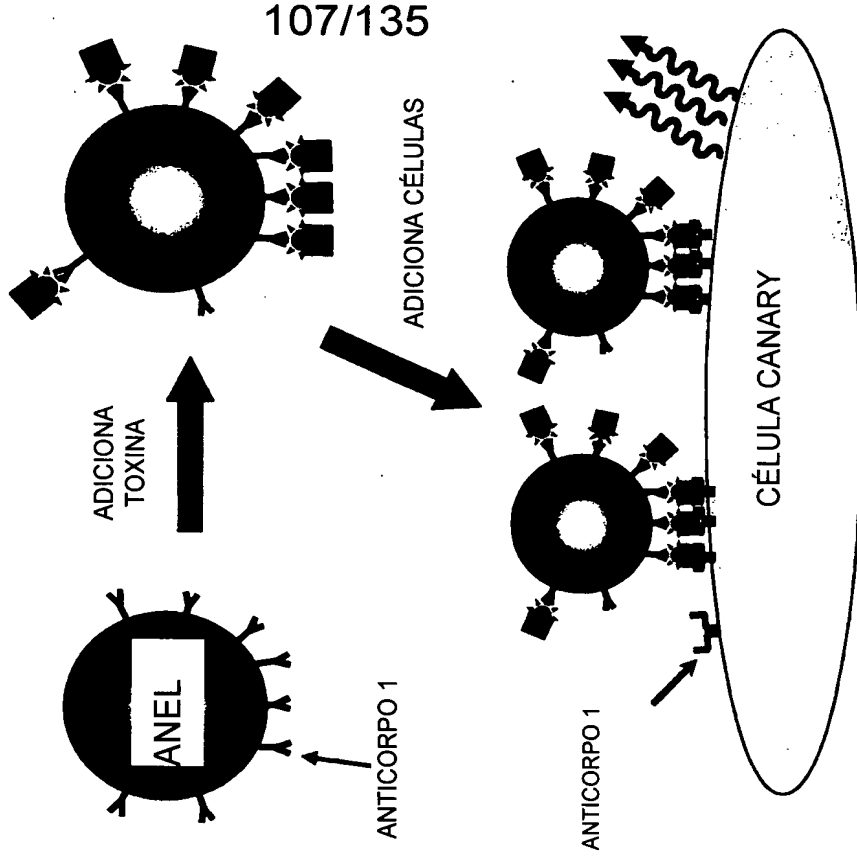
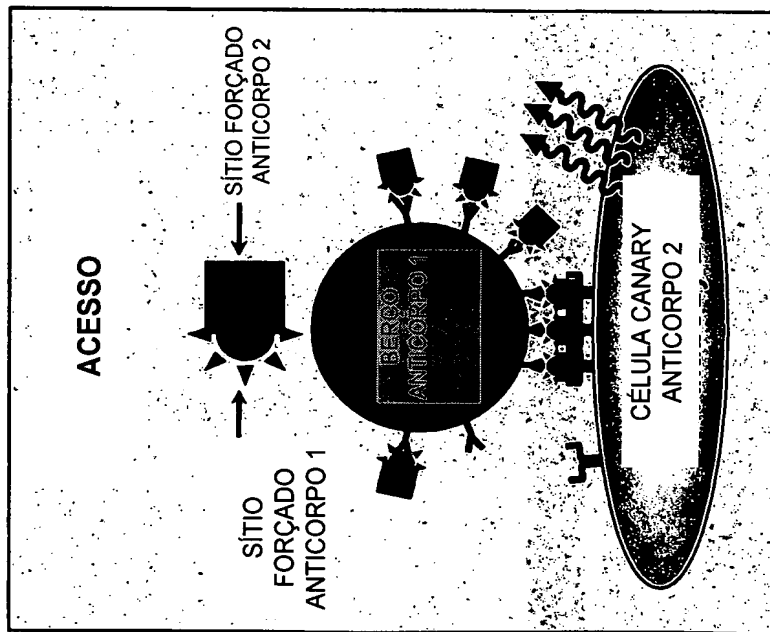
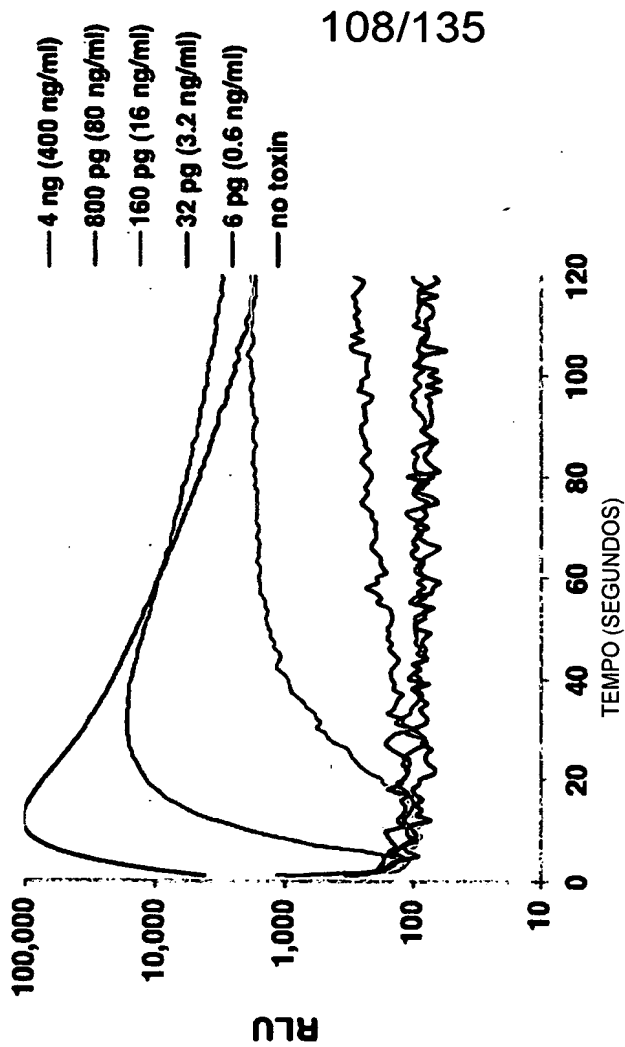


FIG. 143

DETECÇÃO DE TOXINA BOTULÍNICA  
USANDO BERÇO DE CAPTURA



RESULTADOS



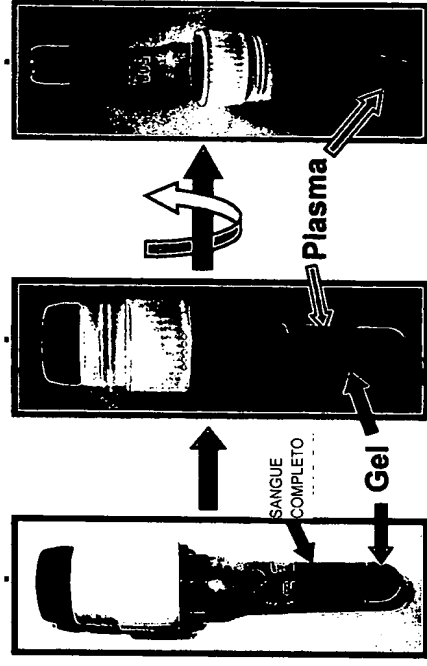
SENSIVIDADE: TOTAL 32 pg (0.000058 X LD<sub>50</sub> A 3.2 ng/ml)

VELOCIDADE: < 6 MINUTOS TOTAL: BERÇO FORÇADO 2-MINUTOS PARA BoNT Hc, LAVE (OPCIONAL), ADIÇÃO E CENTRIFUGAÇÃO DE CÉLULA, DADOS DE AQUISIÇÃO

FIG. 144

## ENSAIO CANARY PARA PATÓGENICOS TRANSMITIDOS PELO SANGUE

ETAPA 1                      ETAPA 2                      ETAPA 3



109/135

\* USO DOS TUBOS DE SEPARAÇÃO DE PLASMA PERMITE RÁPIDA E EFICIENTE ISOLAÇÃO DA BACTÉRIA E VÍRUS DENTRO DA FASE PLASMA DO SANGUE

- ETAPA 1: COLETE 0.5 mL DE SANGUE
- ETAPA 2: CENTRIFUGUE TODO O SANGUE HEPARINIZADO EM PST POR 90 SEG.
- ETAPA 3: COLETE PLASMA CONTENDO BACTÉRIA NO TUBO DE ENSAIO CANARY

\* CENTRIFUGUE PARA PELETIZAR BACTÉRIA; SUBSTITUA O PLASMA COM ENSAIO MEDIO

- ETAPA DE REPOSIÇÃO: 3 MINUTOS

\* TEMPO TOTAL DA COLETA DE SANGUE ATÉ RESPOSTA: ~5 MINUTOS

\* LIMITE DE DETECÇÃO INICIAL:  $10^3$  YERSINIA PESTIS/mL SANGUE (125 cfu/ENSAIO)

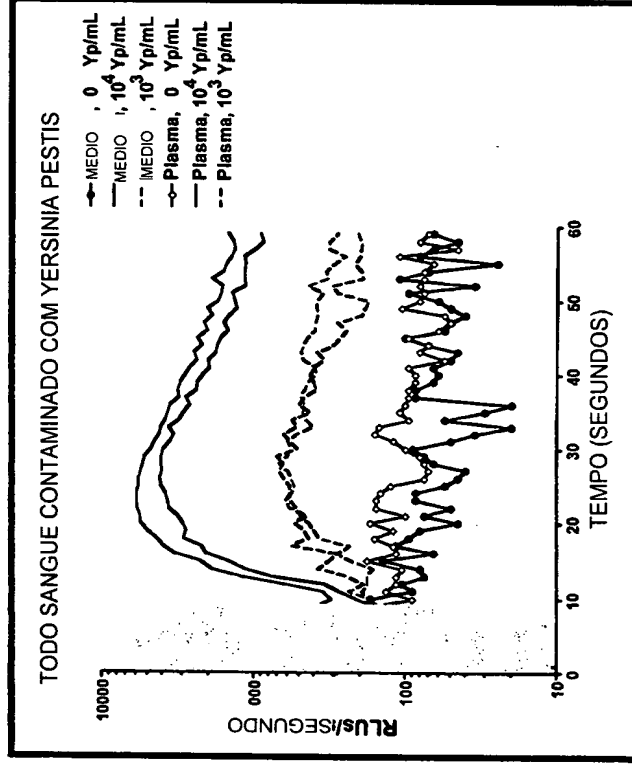
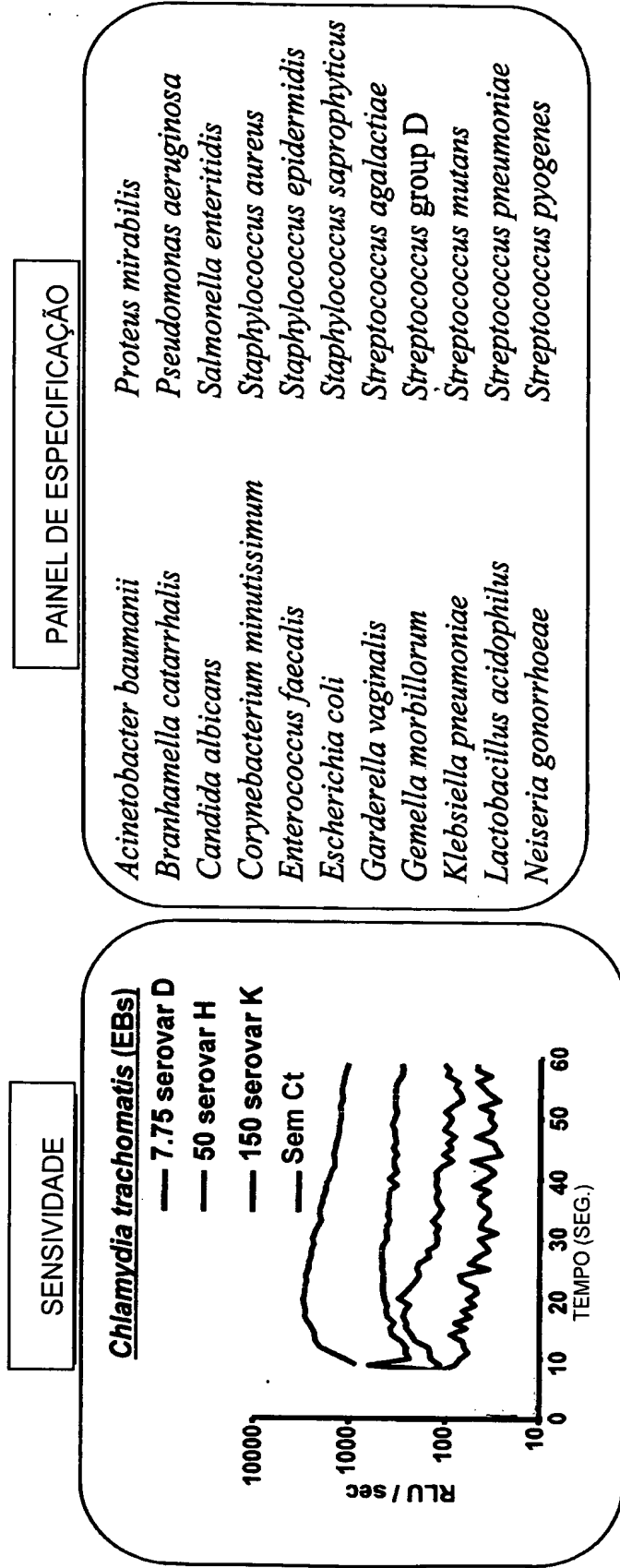


FIGURA 145

RESULTADOS DO ESTUDO CHLAMYDIA EXECUTADO EM BROOKS AFB



• SENSIVIDADE: DETECTA < 50 PARA SORO TIPO D, 50 PARA SORO TIPO H E 150 PARA SORO TIPO K

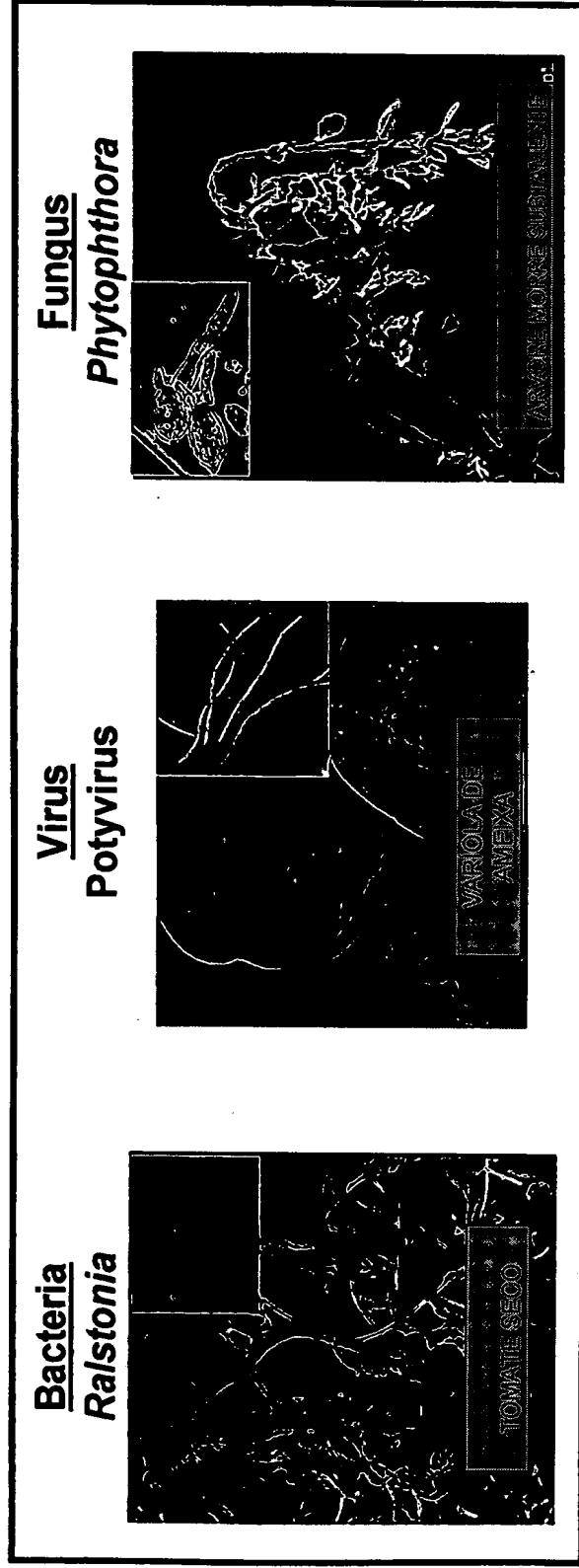
• ESPECIFICAÇÃO: REAÇÃO CRUZADA APRESENTA COM 2 FORAS DE 22 TESTADOS, MAS SOMENTE EM CONCENTRAÇÕES CLÍNICAS IRRELEVANTES

- STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE: POLISACARÍDEOS PODEM SER ENCONTRADOS NA URINA DE PACIENTES COM PNEUMONIA MAS NÃO IRA ATINGIR CÉLULAS CANARY VISTO QUE ELA É MONOMÉRICA
- GEMELLA MORBILLORUM: ORGANISMO INTESTINAL NORMAL QUE PODE CONTAMINAR AMOSTRA DE URINA MAS NÃO A ALTA CONCENTRAÇÕES

FIGURA 146

CANARY PARA PATOGÊNICOS DA AGRICULTURA\*  
 DETECÇÃO CANARY DE PLANTAS PATOGÊNICAS EM LABORATÓRIO & EM PORTOS DE  
 ENTRADA  
 DESENVOLVIMENTO DE LINHAS DE CÉLULA B 3 PLANTA-PATOGÊNICA-ESPECÍFICA

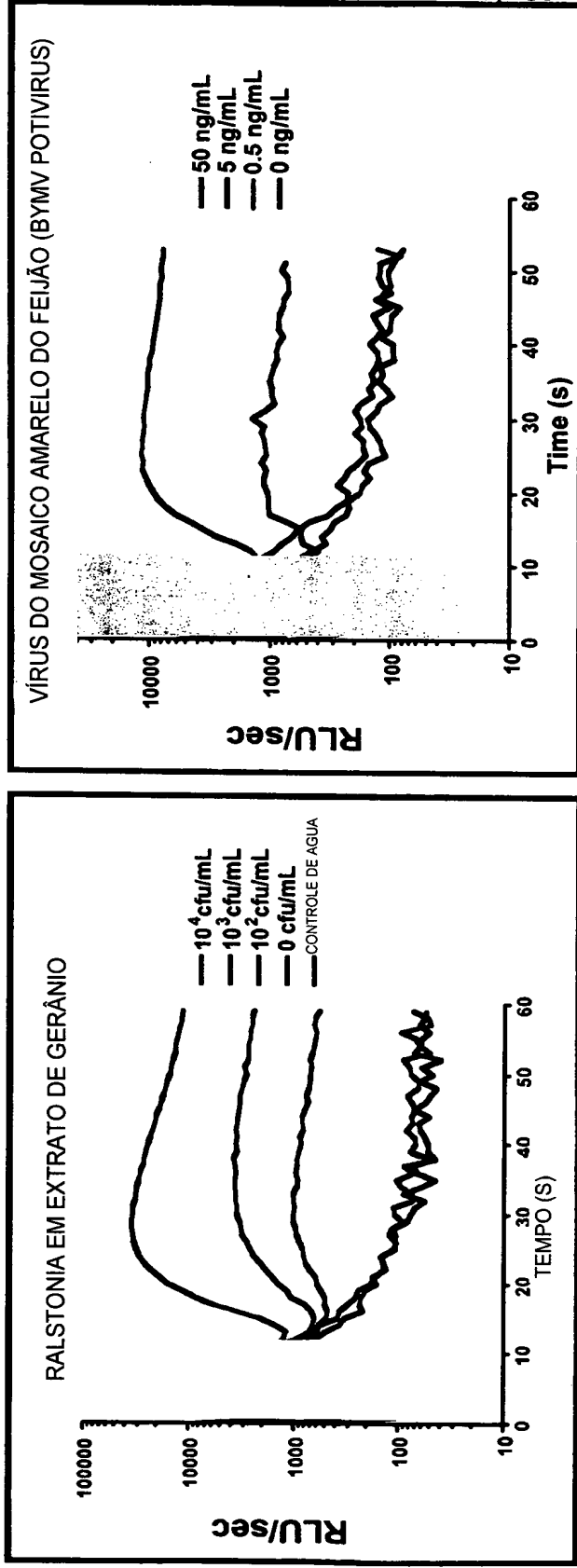
•



- DESENVOLVIMENTO PREPARATÓRIO DE AMOSTRA PARA EXTRAIR PATOGÊNICOS DE AMOSTRAS DE PLANTAS
  - TESTE E VALIDAÇÃO A SER CONDUZIDO EM LABORATÓRIO COM USDA
  - PROGRAMA DE ACOMPANHAMENTO E OBTENÇÃO PARA DESENVOLVIMENTO DE CANARY PARA DOENÇAS DO GRUPO CÍTRICO
- \* PATROCINADO PELO CENTRO USDA-APHIS-PPQ PARA TECNOLOGIA E CIÊNCIA E SAÚDE DA PLANTA

**FIG. 147**

## DETECÇÃO DE PATOGENICOS DE PLANTAS POR CANARY



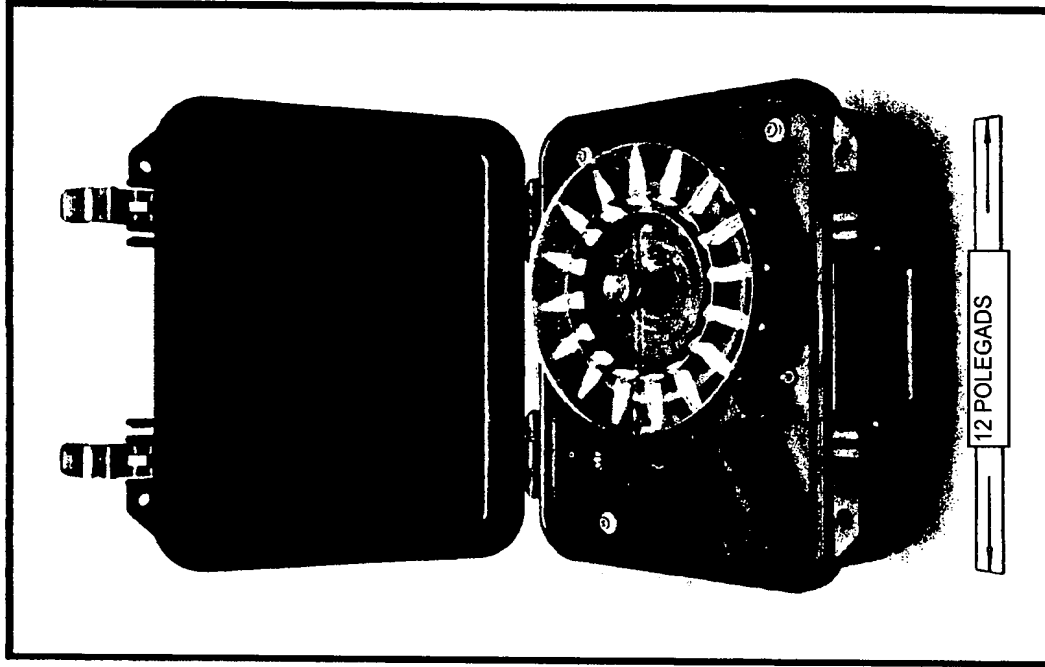
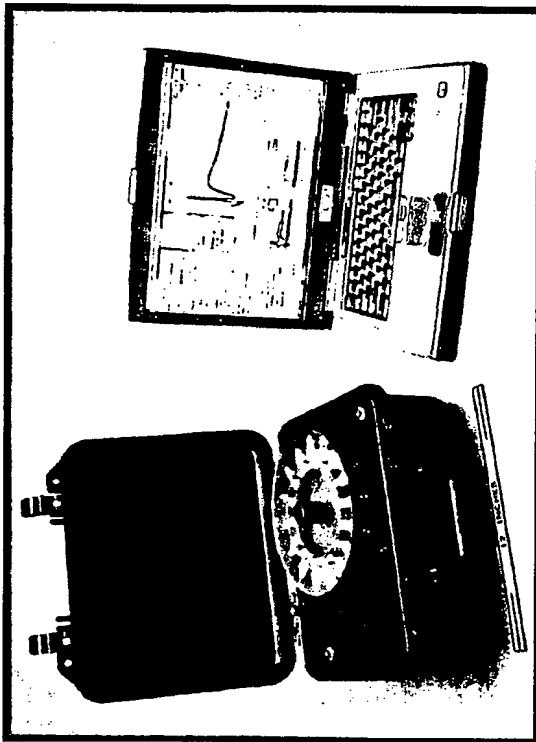
112/135

- DETECÇÃO DE 100 cfu/mL ( TESTE 5 cfu/CANARY) DE RALSTONIA SOLANACEARUM EM EXTRATO DE GERÂNIO APÓS ETAPA MÉDIA -REPOSIÇÃO
- DETECÇÃO DE 5ng/mL ( TESTE 0.05 ng/CANARY) DE BYMV
  - ANEXAÇÃO DE VÍRUS AO BERÇO PARA FACILITAR DETECÇÃO, ESPECIALMENTE DO COMPLEXO DE MATRIZES
  - COLETA PARA DETECÇÃO EM MENOS DE 7 MINUTOS
- RESULTADOS COMPAVÁVEL COM OU MELHOR QUE A TECNOLOGIA EXISTENTE EM UMA FRAÇÃO DE TEMPO

FIGURA 148

SENSOR CANARY PORTÁTIL DE 16-CANAIS

113/135

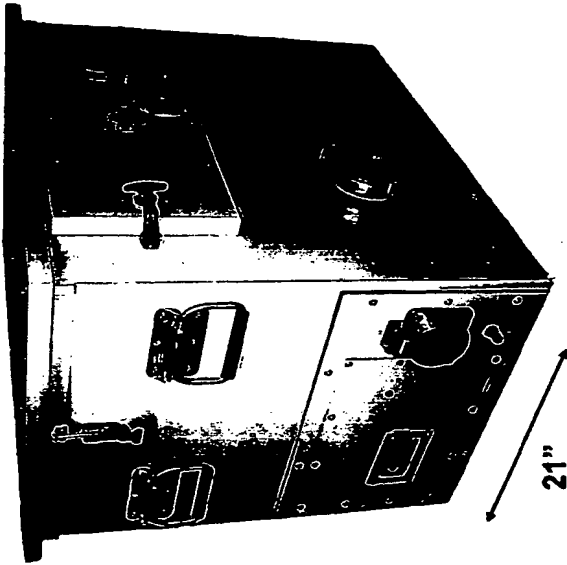


- MONITORES COM 16 AMOSTRAS COM UM PMT
- MARCAS DE SENSIVIDADE SENSOR SIMPLES -CANAL
- EQUIPAMENTO REFINADO PARA USO EM CAMPO
  - ELIMINA CENTRIFUGAÇÃO SEPARADA
  - ADAPTÁVEL A ENERGIA DE BATERIA
- AUMENTO DA EFICIÊNCIA DE AMOSTRA
  - ESTIMADO 100 AMOSTRA/HORA

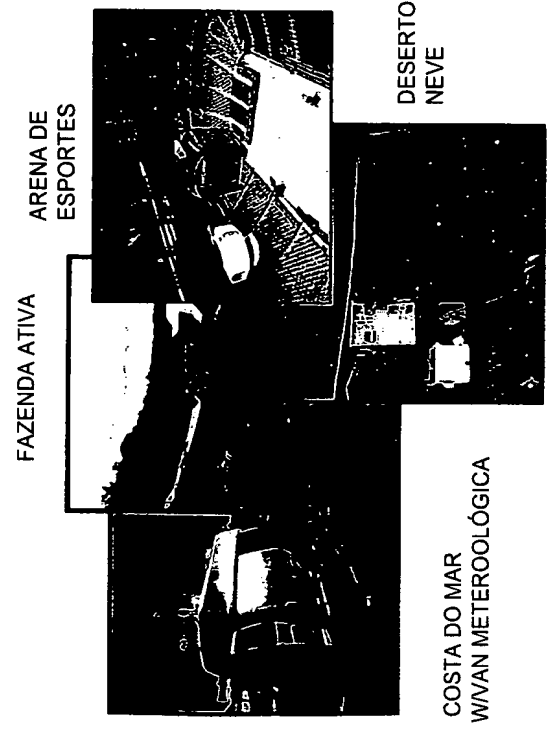
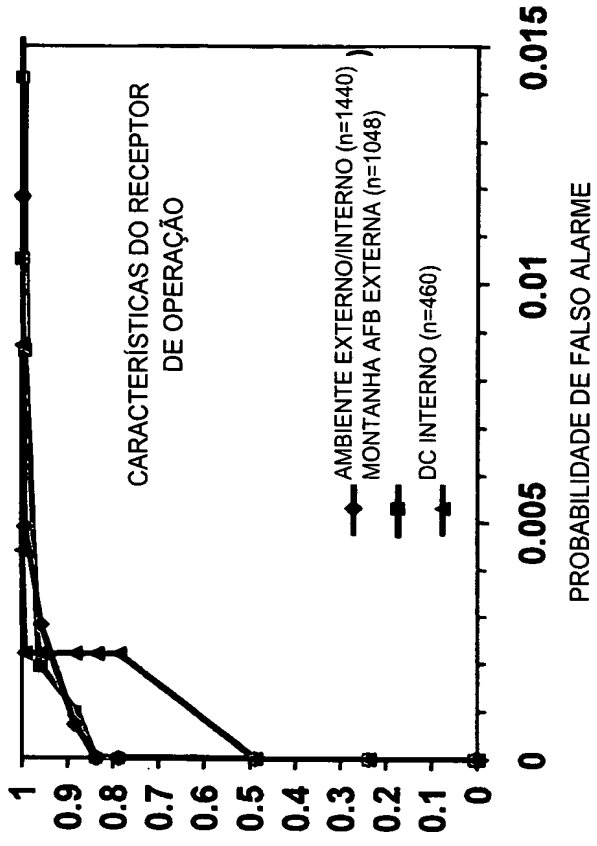
FIGURA 149

**BERÇO DE TESTE AUTOMÁTICO BIOAEROSSOL CANARY (BCAN)**

- PRIMEIRO DETECTADO-PARA-ALARME SENSOR BIO-ID
  - COLEÇÃO AUTOMÁTICA BIOAEROSSOL, TESTANDO E DEMONSTRADO EM < 2 MINUTOS
  - GATILHO DO SENSOR POR BAWs OU MANUAL DE GATILHO
  - ACIMA DE 11,000 TESTES COMPLETADOS EM CAMPO
- P<sub>FA</sub> 0.2 A 0.3 % COM 96% DE PROPABILIDADE DE ID PARA ≥ 100 ACPLA; < 0.1 % PARA DUPLA RETUNDÂNCIA



PROBABILIDADE DE ID (≥ 100 ACAPLA)



**FIG. 150**

DESENVOLVIMENTO PANTHER  
(ANALIZADOR PATOGENICO PARA TRATAMENTO DE LIBERACAO AMBIENTE)

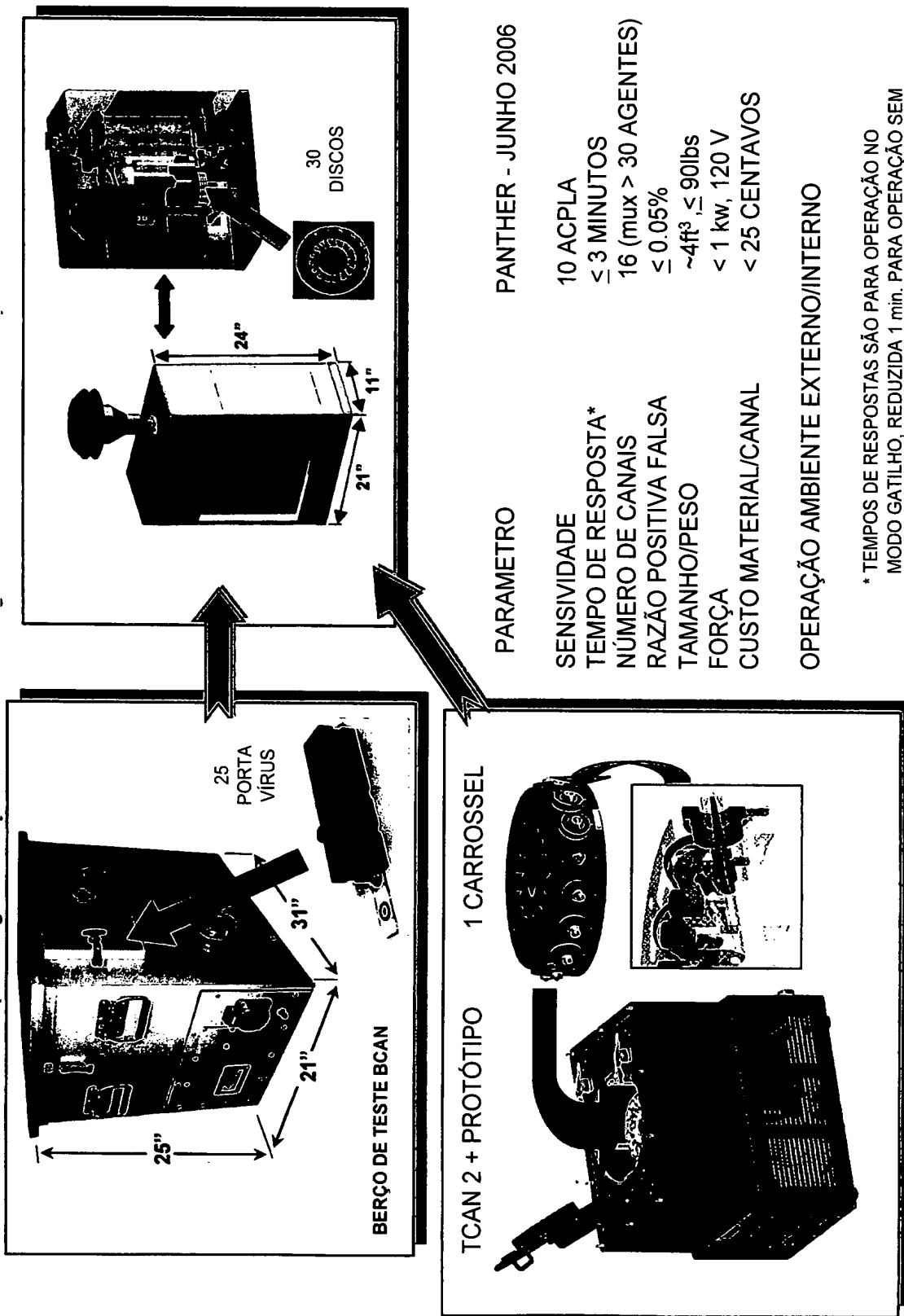
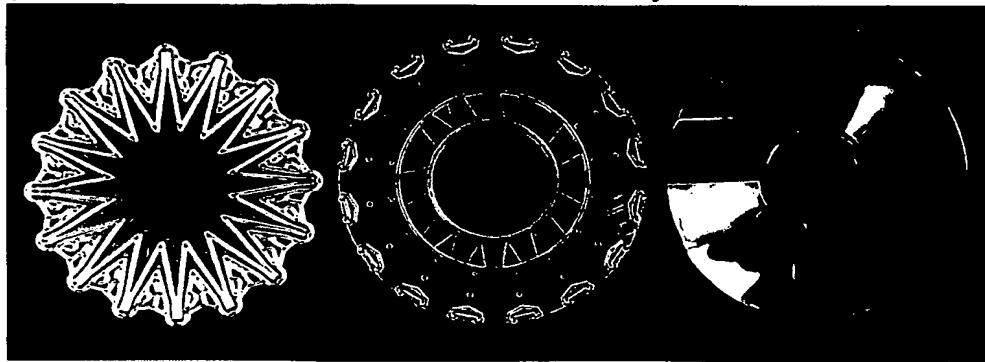


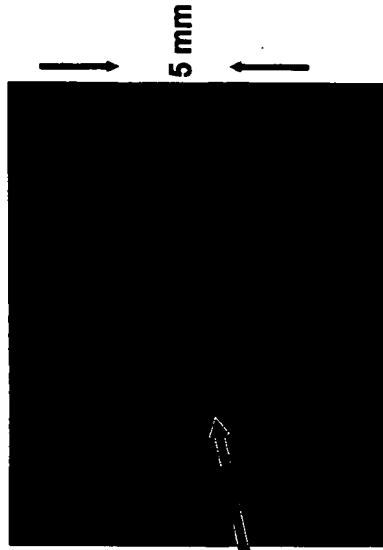
FIG. 151

DISCO DE DESENVOLVIMENTO INTEGRADO PANTHER  
 PROTÓTIPO DE MONTAGEM RÁPIDA

4 3/4"



VISTA LATERAL



PARTÍCULAS FLUORESCENTE 1µm  
 DEPOSITADAS NAS RANHURAS

116/135

CANAL SIMPLES

• EXECUTA COLEÇÃO AEROSSOL INTEGRADO E DETECÇÃO DE FUNÇÕES

- MEDIDAS PRELIMINARES DE FLUXO E CAMERA DE TESTE COM  
 SIMULANTES COMPLETO -- ENCONTRA ESPECIFICAÇÃO

- FAZENDO MOLDAGEM DE PARTES POR INJEÇÃO DE BAIXO  
 CUSTO

EM PILIPROPILENO PARA FUTUROS TESTES

FIG. 152

SUMÁRIO

MELHOR COMBINAÇÃO DE VELOCIDADE E SENSIVIDADE PARA IDENTIFICAÇÃO DE PATOGENICOS

- < 50 PARTÍCULAS EM < 3 min. PARA AMOSTRAS LÍQUIDAS

- ID DENTRO 1 MINUTO ENCONTRA COLEÇÃO DE AMOSTRAS DE AEROSSOL

- SENSORES DE AEROSSOL PRIMEIRO DETECTA-PARA-ALARME: > 13,000 TESTES COM EXLENTE PERFORMANCE ROC

UTILIDADE DEMONSTRADA PARA UMA GRANDE VARIAÇÃO DE APLICAÇÕES EM AMOSTRAS COMPLEXAS

- BACTÉRIA

- VÍRUS

- TOXINAS

- SEQUÊNCIA DNS/RNA

- FUNGO

- BIOAEROSSOL ID

- DIAGNÓSTICOS MÉDICOS

- MONITORAÇÃO DA AGRICULTURA

- TESTES AMBIENTAIS

- TESTES DE SEGURANÇA DE ALIMENTOS  
- LINHA RÁPIDA DE CÉLULAS (DOENÇAS EMERGENTES)

DESENVOLVIMENTO DE SENSORES CONFIÁVEIS COM LOGÍSTICA AVANÇADA DE CÉLULA

FIG. 153

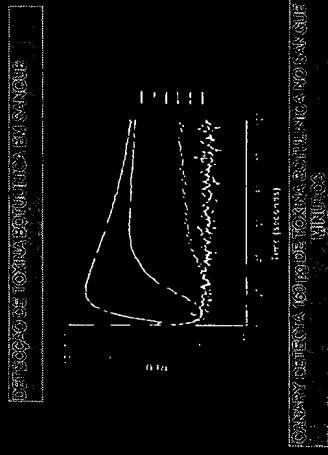
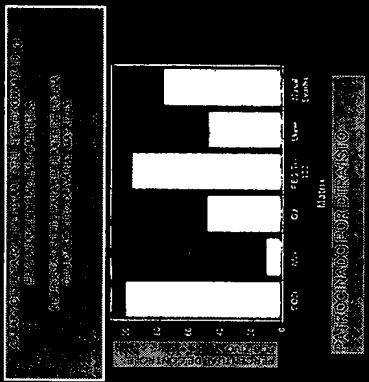
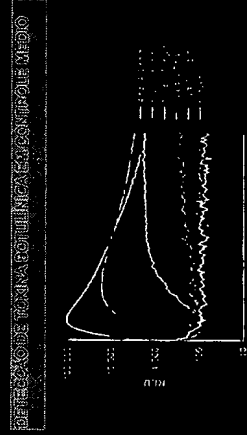
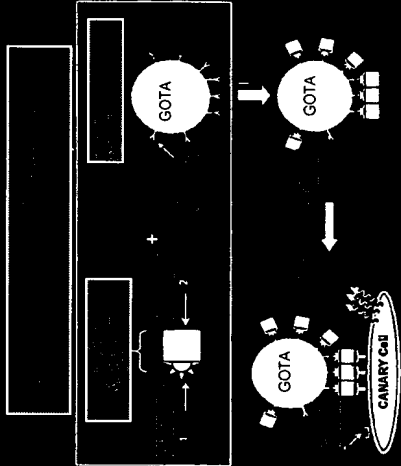
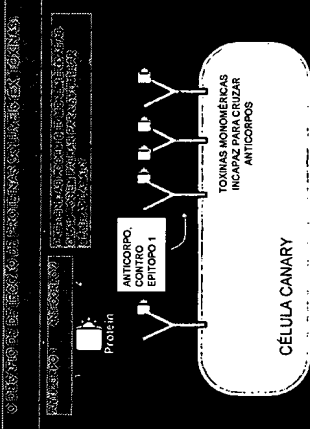
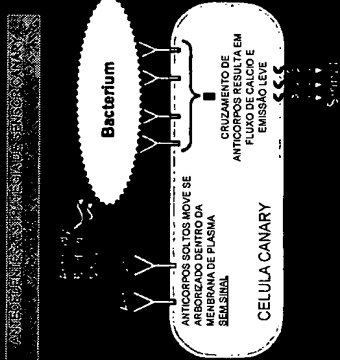


Erir, Schwoebel, Kelly Theriault, Martha Peinowick, Fran Nargi, James Harper, Todd Ritter and Mark Hollis

**PROBLEMA**  
 SOLUVEL, PROTEINAS MONOMERICAS SÃO INCAPAZES DE CRUZAR ANTI-CORPOS NA SUPERFICIE DA CÉLULA CANARY

**SOLUÇÃO**  
 CAPTURE PROTEINA SOLUVEL NAS GOTAS DE MODO QUE A CÉLULA CANARY É APRESENTADA COM TOXINA POLIMERIZADA RESULTADOS INICIAIS

DETECÇÃO DE 32 pg DE TOXINA BOTULÍNICA EM MENOS DE 6 MINUTOS (0.000058 X LD<sub>50</sub>)



TESTE SENSÍVEL PARA A SINDROME BOTULÍNICA

Matriz	Velocidade	Sensibilidade	Condições Ideais
SANGUE	7 min	32 pg (0.000058 x LD <sub>50</sub> )	160 pg (0.00028 x LD <sub>50</sub> )
MATRIZES LÍQUIDAS	6 min	32 pg (0.000058 x LD <sub>50</sub> )	160 pg (0.00028 x LD <sub>50</sub> )

**ACOMPANHAMENTOS E DIREÇÕES FUTURAS**

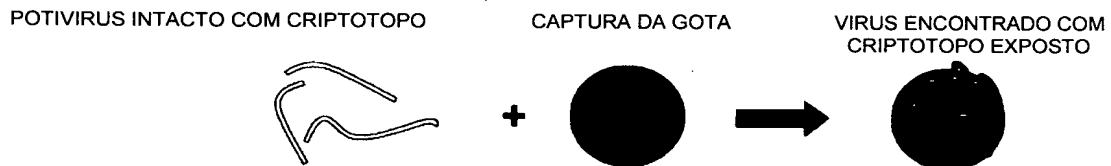
- CAPACIDADES CORRENTES DE TESTE
  - VELOCIDADE: 7 min. PARA SANGUE 6 min. PARA MATRIZES LÍQUIDAS
  - SENSIBILIDADE: 32 pg (0.000058 X LD<sub>50</sub>) SOB CONDIÇÕES IDEAIS
- DIREÇÕES FUTURAS
  - OBJETIVO: TOXINA BOTULÍNICA TIPO A
  - ANTICORPOS MÚLTIPLOS NAS GOTAS
  - FORMATO COLUNA PARA AUMENTAR RAZÃO DE REFORÇO
  - APLICAR PARA DETECÇÃO DE OUTRAS TOXINAS (SERICIN, MAIS SOROTIPOS BONT)

For Workshop Use Only

FIG. 154



## EXTRAÇÃO DE POLIVIRUS DE UM TECIDO DE PLANTA INFECTADO



GOTAS DE POLISTERINE SÃO ADICIONADAS PARA MACERAR O TECIDO DA PLANTA; POTIVIRUS ENCONTRA QUASE INSTANTEAMENTE COM A GOTA

### VANTAGENS DO USO DE CAPTURA DE GOTA:

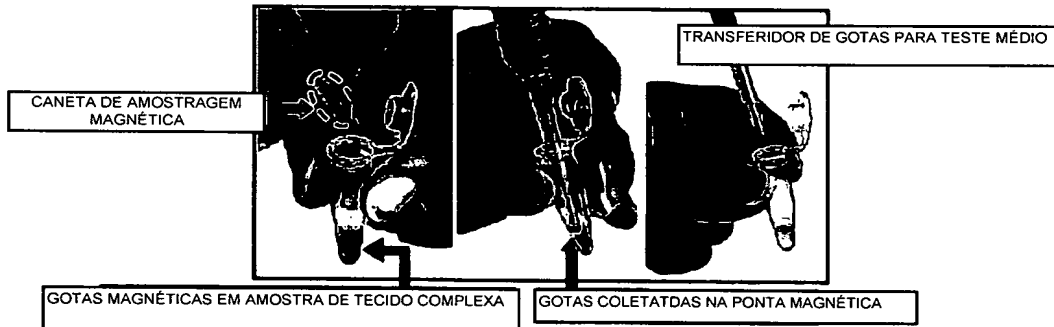
- \* EVENTO FORÇADO EXPÕE O CRIPTOTOPO RECONHECIDO PELAS CÉLULAS B
- \* GOTAS FORÇADAS AUMENTAM SENSIBILIDADE DE TESTE CANARY POR PERMITIR DE OUTRA MANEIRA VIRUS NÃO SENDIMENTÁVEL PARA SER CONCENTRADO DENTRO DE UM PELET
- \* PELO USO DE GOTAS MAGNÉTICAS, O VIRUS PODE SER PUXADO PARA FORA DO TESTE POTENCIALMENTE - INTERFERINDO RESTO DE PLANTA
- \* VIRUS BOLHA-FORÇADA É REALMENTE DETECTADO NO TESTE CANARY

FIG. 156

121/135

## PREPARAÇÃO PARA TECIDO DE PLANTA FITOPTORA- INFECTADA

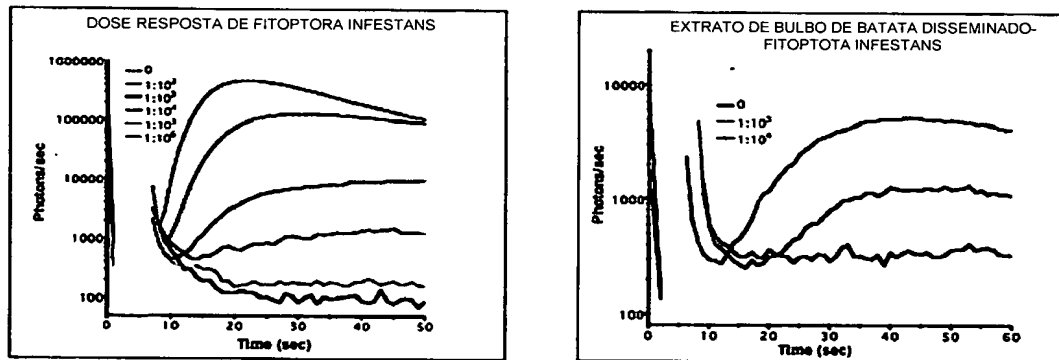
- AMOSTRA DE TESTE DE TECIDO DE PLANTA MACERADA INCUBADA POR 15 MINUTOS COM GOTAS MAGNÉTICAS COBERTAS COM ANTICORPO-ANTI-FITOPTORA



- INSIRA CANETA DE AMOSTRAGEM DENTRO DA AMOSTRA PARA COLETAR BOLHAS-FORÇADAS COM MUCELIA FITOPTORA
- TRANSFIRA GOTAS PARA TUBO LIMPO CONTENDO TESTE MÉDIO CANARY
- PROCEDA COM TESTE CANARY PADRÃO PARA TESTAR PRESEÇA DE FITOPTORA NA AMOSTRA DE TESTE

FIG. 157A

## DETECÇÃO DE FITOPTORA POR CANARY



- DEMONSTRAÇÃO DE CÉLULAS CANARY A RESPOSTA DE DOSE-DEPENDENTE PARA FITOPTORA SPP.\* MICELIA
- CAPTURA DE GOTA MAGNÉTICA DE FITOPTORA DE UMA EXTRATO COMPLEXO DE AMOSTRA-TECIDO-PLANTA ELIMINA INTERFERÊNCIA DE TESTE
- TEMPO TOTAL DE ENSAIO INCLUINDO PREPARAÇÃO DE AMOSTRA E FORÇAGEM DE GOTA É 20 MINUTOS

\*HIBRIDOMAS FORNECIDOS POR NEOGEN CORP.

FIG. 157B

08-11-05es

Bont/A EM URINA, LAVADA, 15 MINUTOS DE LIGAÇÃO

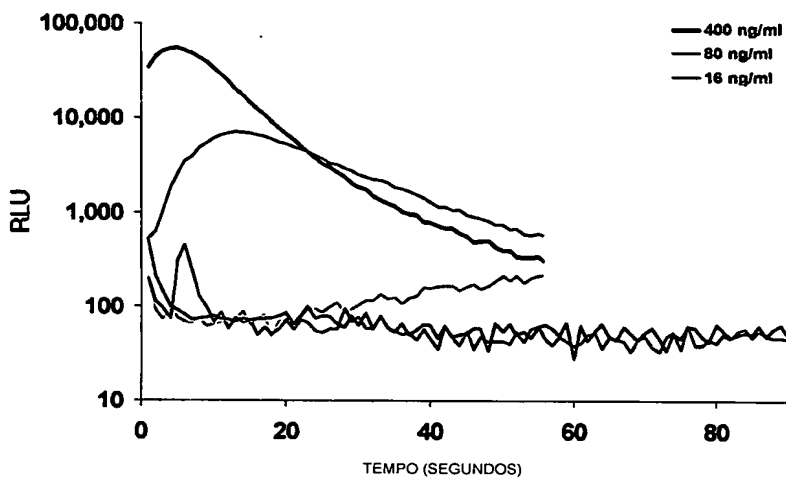


FIG. 158

DETECÇÃO DE BONT/A EM SANGUE, ETAPA DE LIGAÇÃO CURTA

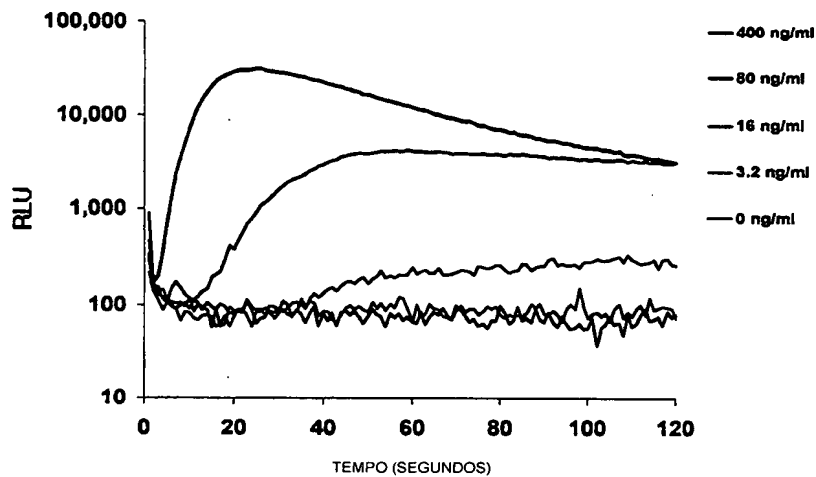


FIG. 159

123/135

DETECÇÃO DE BoNT/A EM SANGUE, ETAPA DE LIGAÇÃO CURTA

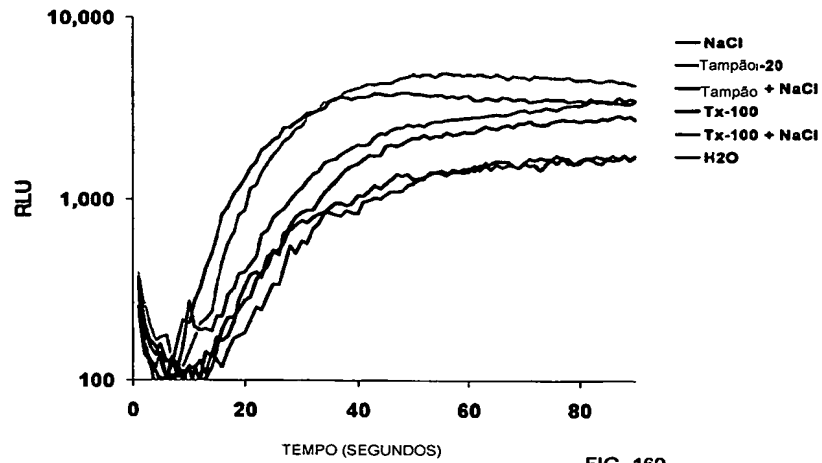


FIG. 160

Células 6B2-2

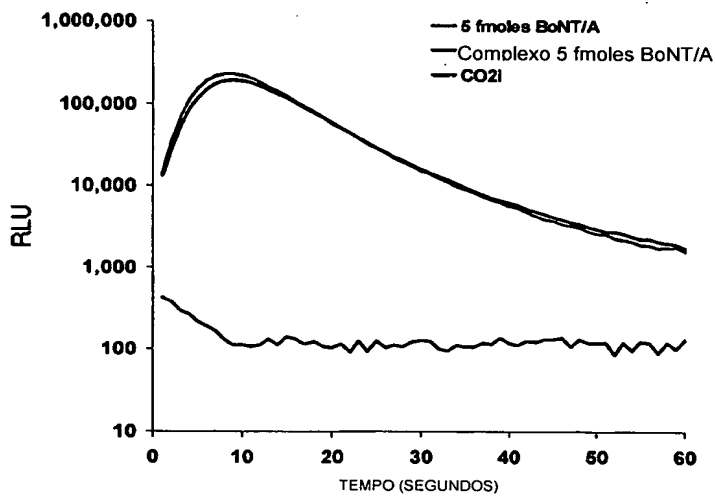


FIG. 161

DETECÇÃO DE TOXINA BOTULÍNICA: 10 MICROLITROS DE

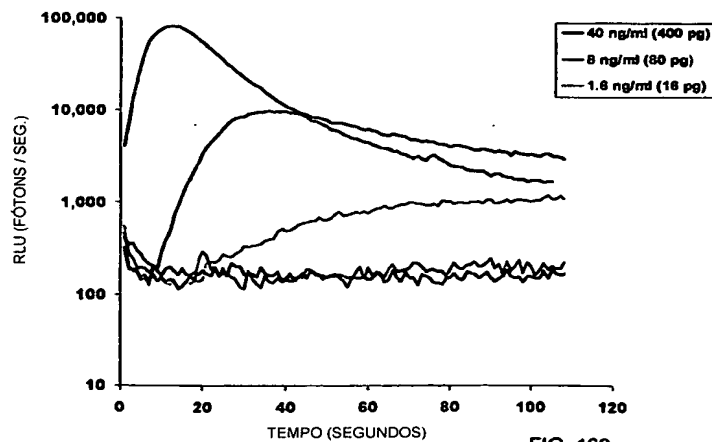


FIG. 162

DETECÇÃO RADIOLÓGICA POR CANARY

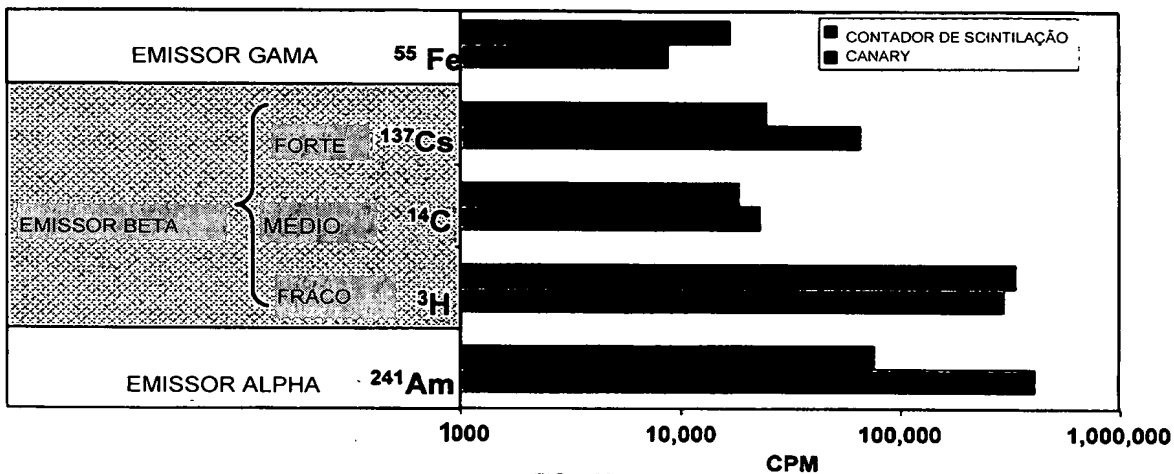


FIG. 163

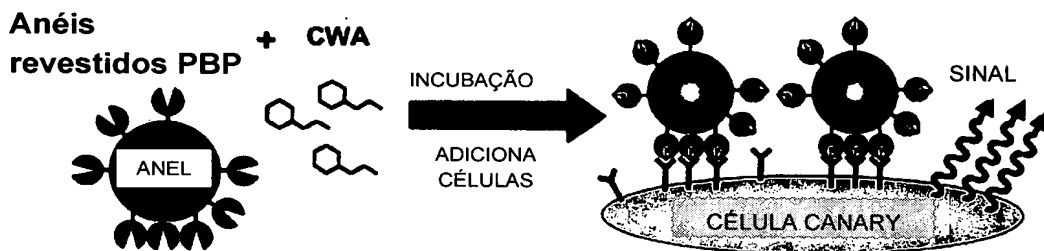
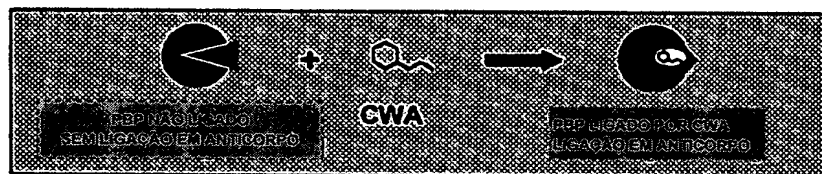


FIG. 164

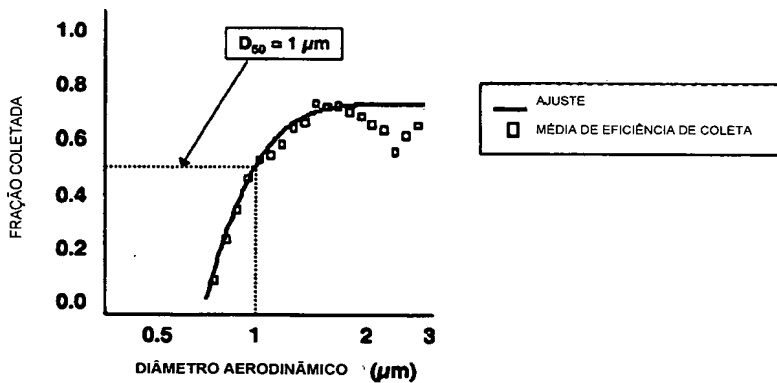


FIG. 165

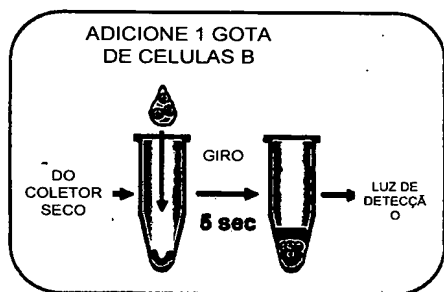


FIG. 166A

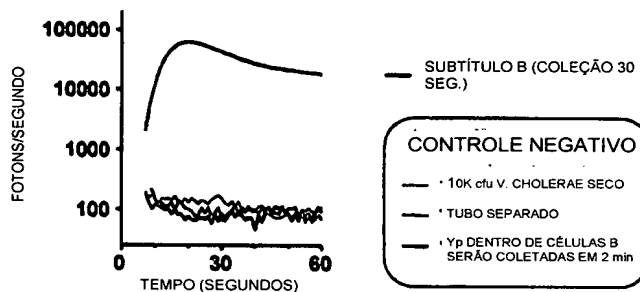


FIG. 166B

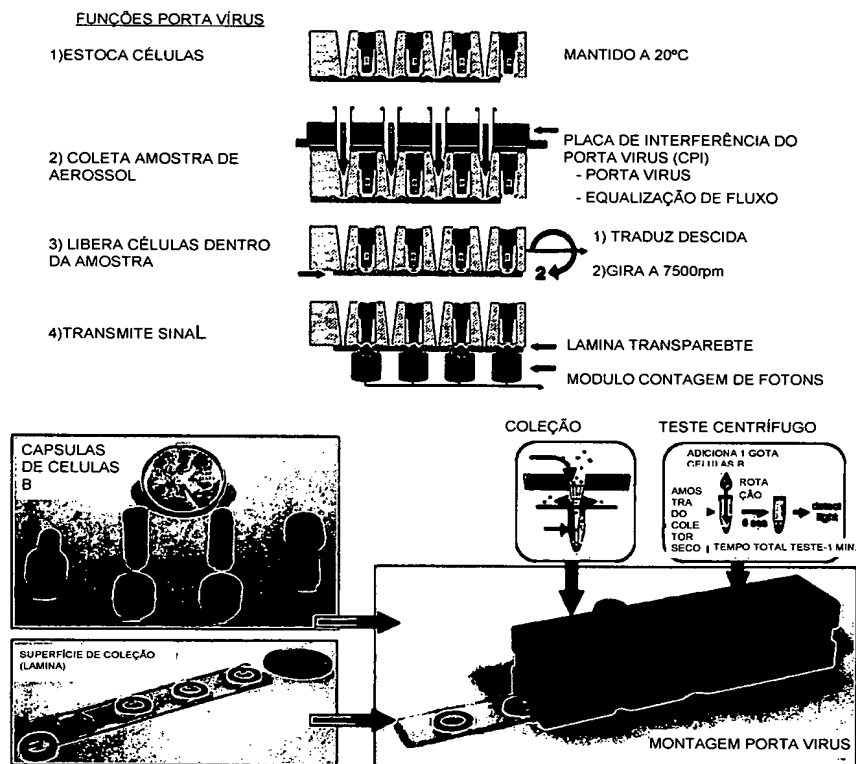


FIG. 167

126/135

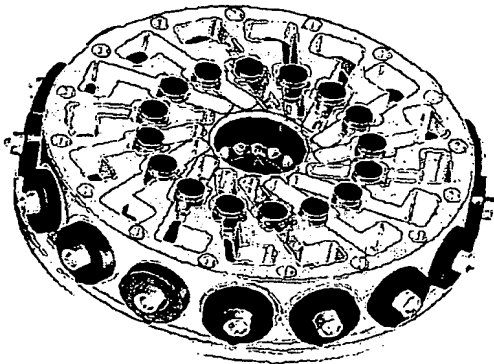


FIG. 168

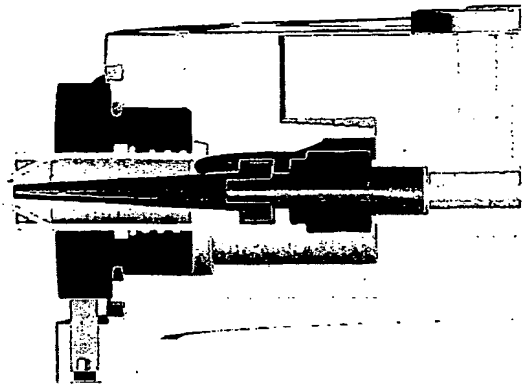


FIG. 169

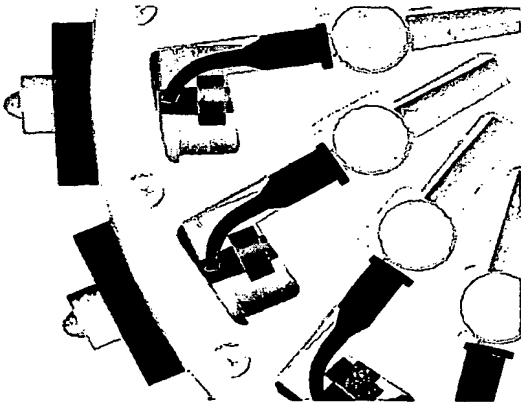


FIG. 170

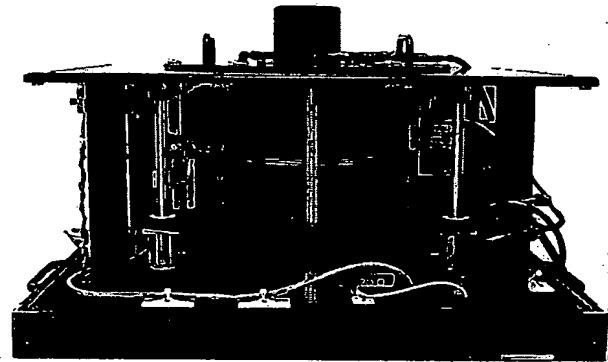


FIG. 171

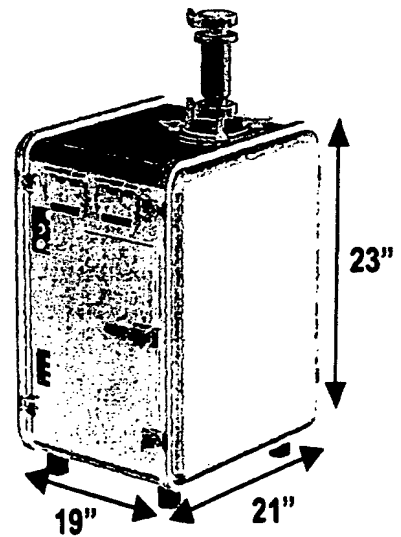
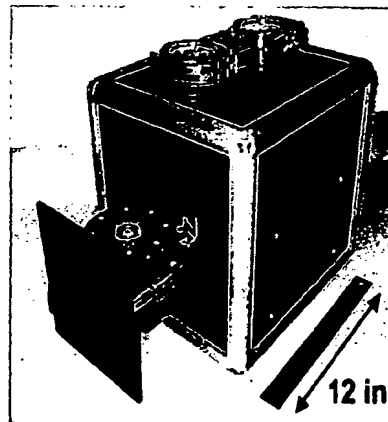


FIG. 172

127/135

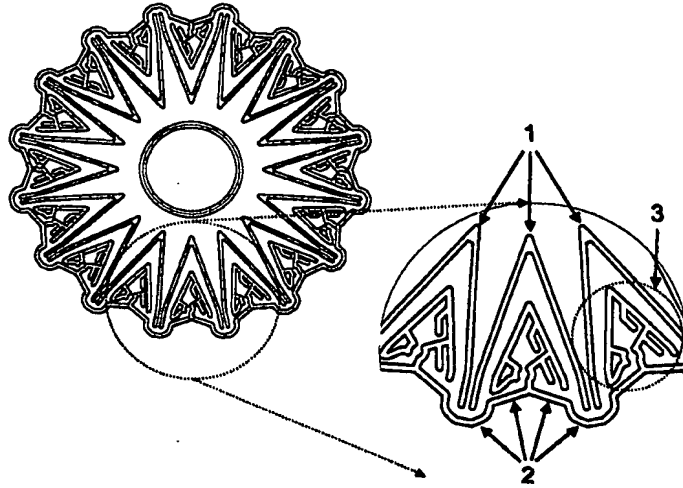


FIG. 173A

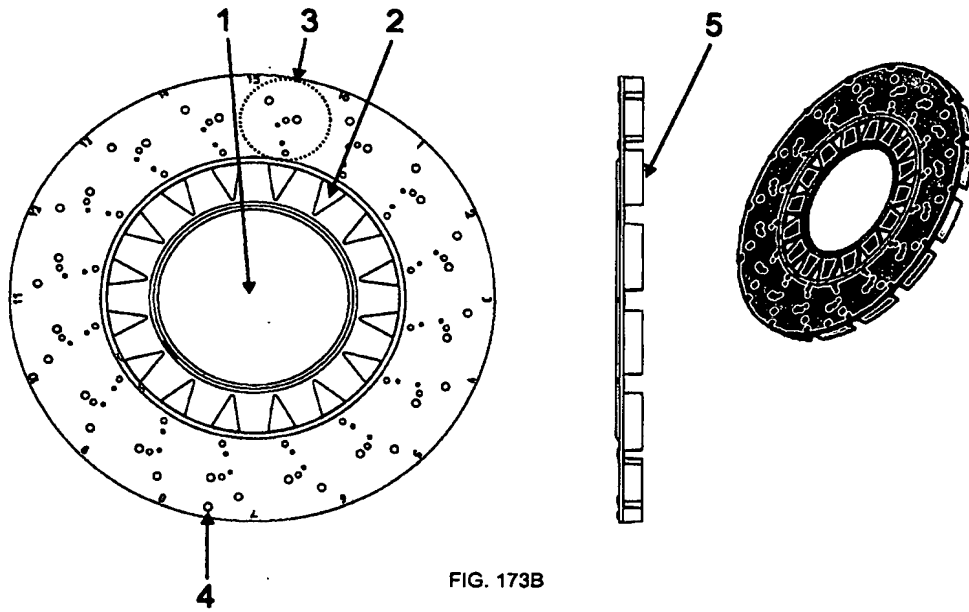


FIG. 173B

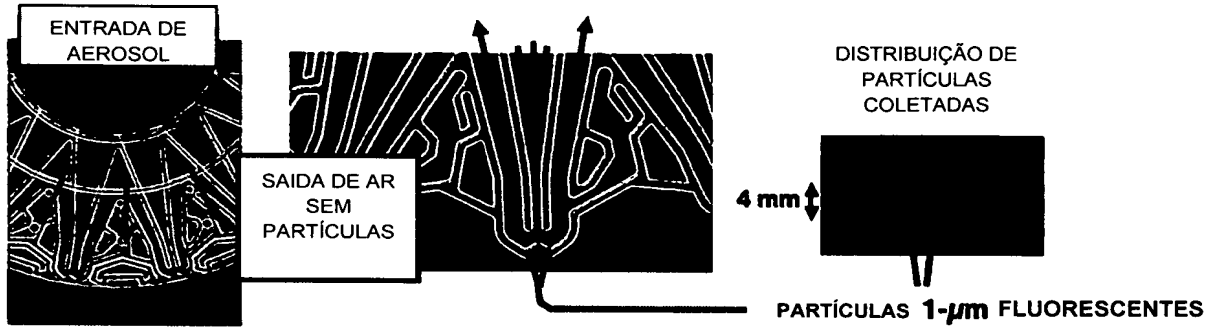


FIG. 174

(NORMALIZADO A 30L/miN POR CANAL COM CANAL DE 1mm LARGURA)

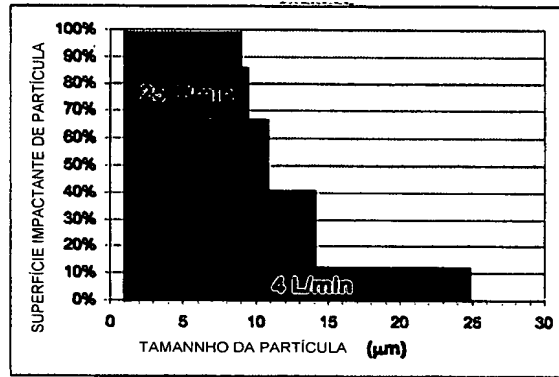


FIG. 175

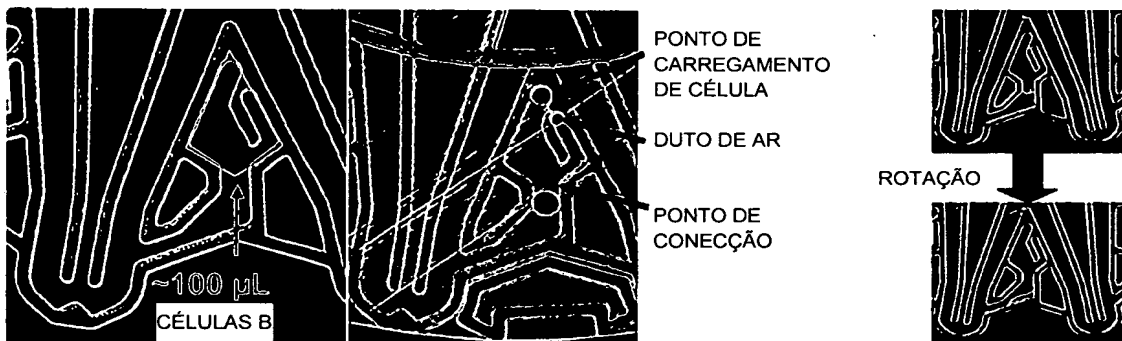


FIG. 176

129/135

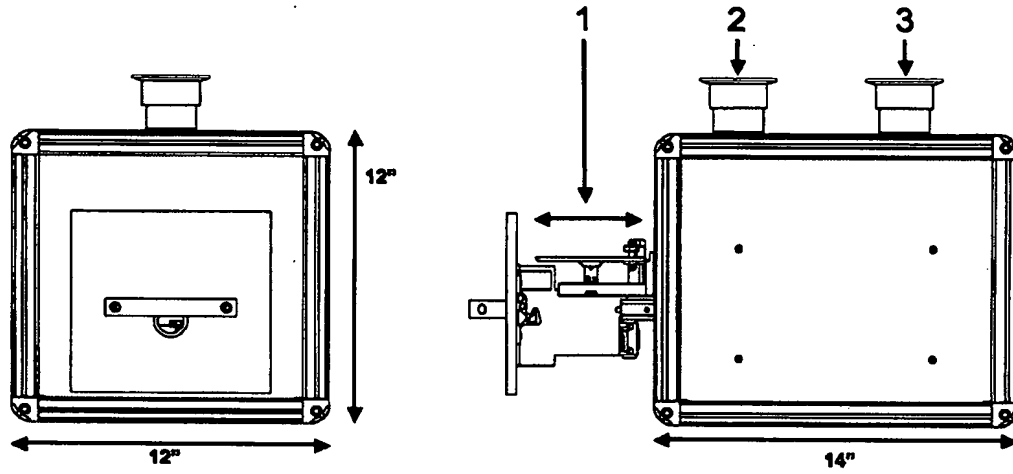


FIG. 177

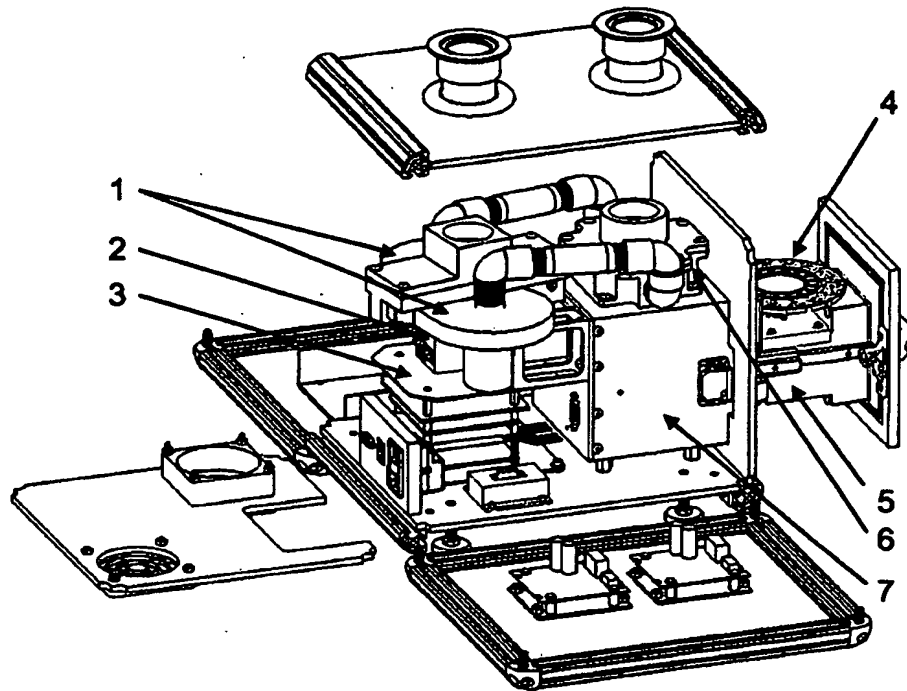
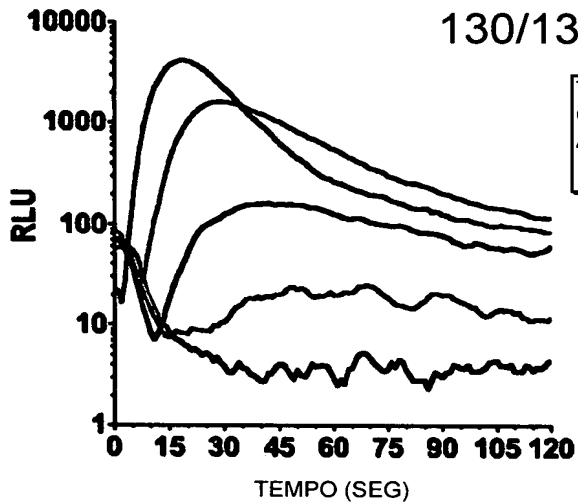


FIG. 178

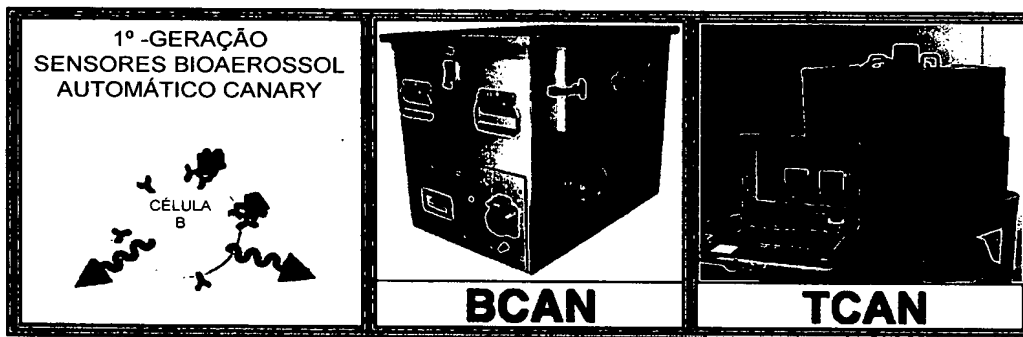


TESTANDO CAMERA CONTRA  
COLLISION - GERADO POR  
AEROSSOIS ESPORO BS

- 1:8 Bs Stock (~4000 ACPLA)
- 1:80 Bs Stock (~600 ACPLA)
- 1:800 Bs Stock (~50 ACPLA)
- 1:8000 Bs Stock (? ACPLA)
- DI ÁGUA

DADOS RAZOÁVEIS  
1 min DE COLETA  
ANTES DA ANÁLISE

FIG. 179



2ª GERAÇÃO- FAMÍLIA SENSOR PANTHER

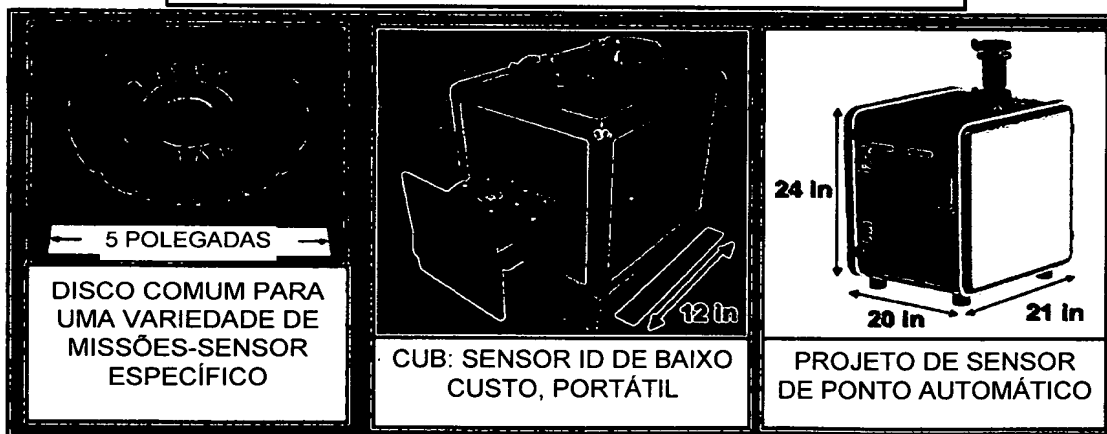
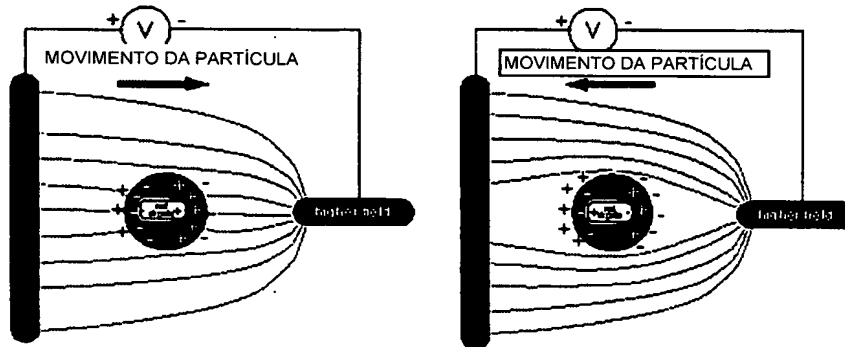


FIG. 180



DIELETRÓFORESE POSITIVA:  
 PARTÍCULA É MAIS POLARIZADA QUE A MÉDIA.  
 MALHA DIPOLAR TEM ORIENTAÇÃO OPOSTA PARA O CAMPO EXTERNO  
 PARTÍCULAS MOVEM PARA TRAZ DA REGIÃO ALTA DO CAMPO

DIELETRÓFORESE NEGATIVA:  
 PARTÍCULA É MENOS POLARIZADA QUE A MÉDIA  
 MALHA DIPOLAR TEM A MESMA ORIENTAÇÃO QUE O CAMPO EXTERNO  
 FLUIDO MOVE PARA A ALTA REGIÃO DO CAMPO, EMPURRANDO A PARTÍCULA PARA A REGIÃO BAIXA DO CAMPO

FIG. 181

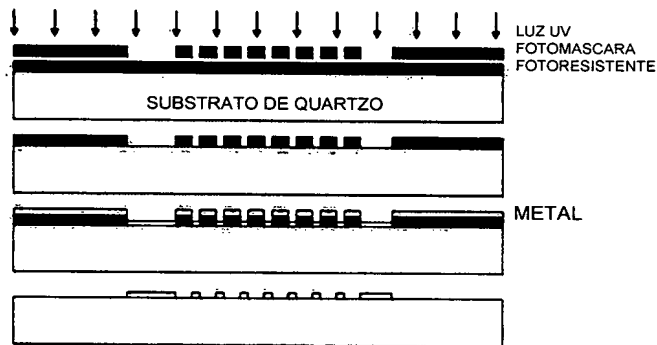


FIG. 182

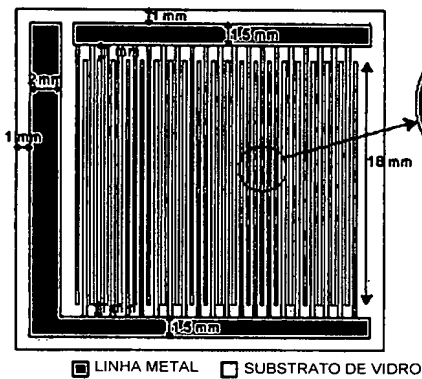


FIG. 183A

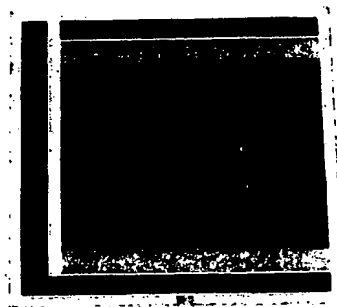


FIG. 183B

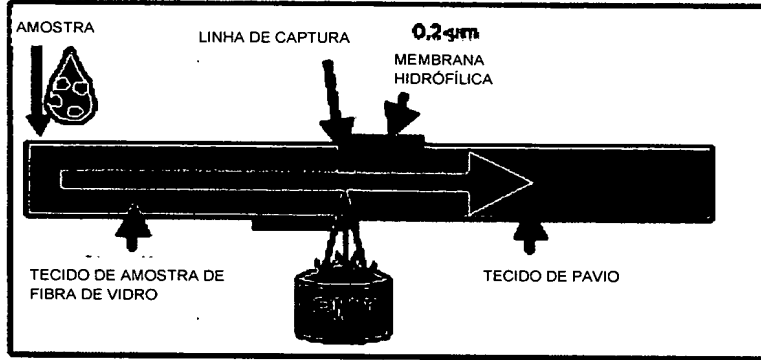


Fig. 184

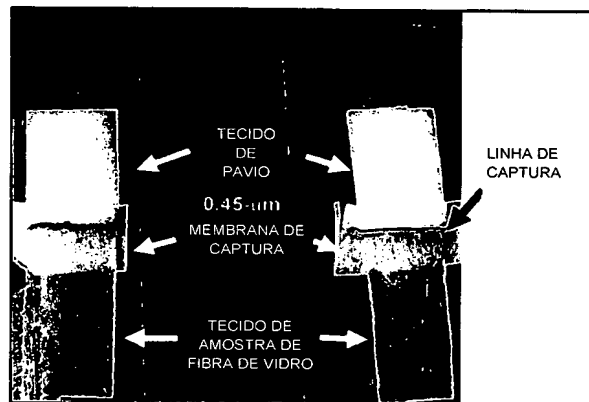


FIG. 185

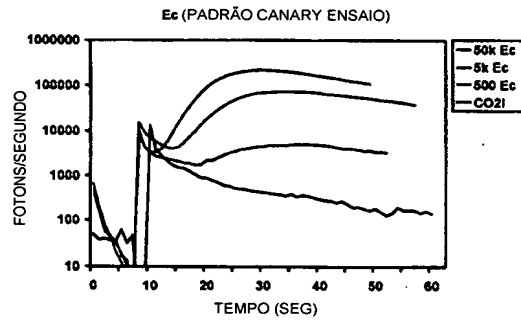


FIG. 186A

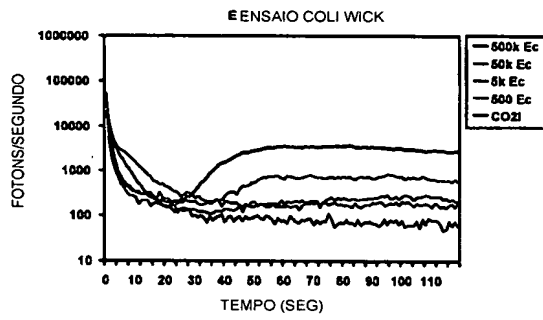


FIG. 186B

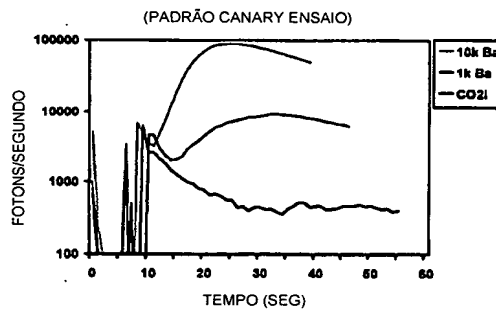


FIG. 186C

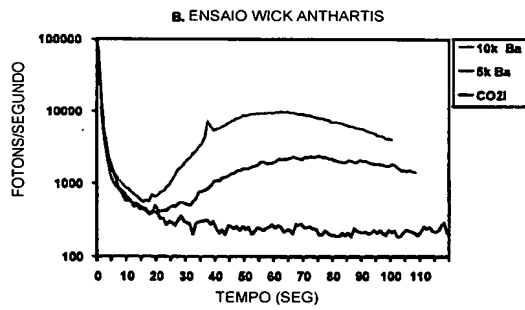


FIG. 186D

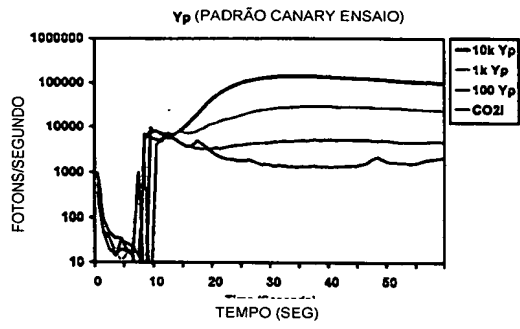


FIG. 187A

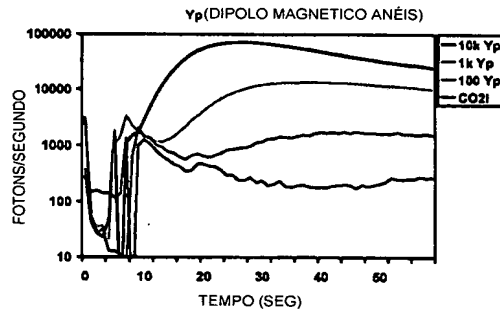


FIG. 187B

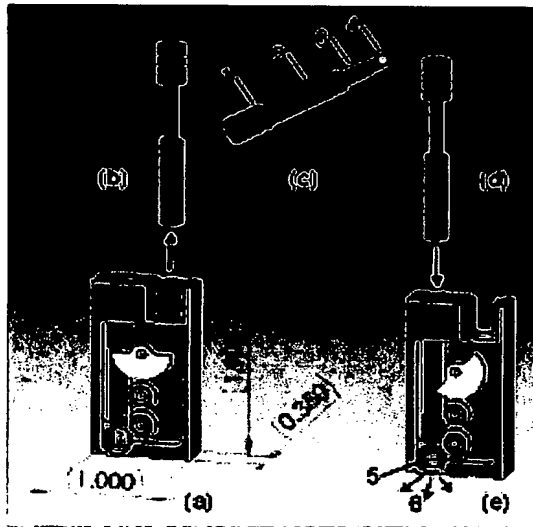


FIG. 188

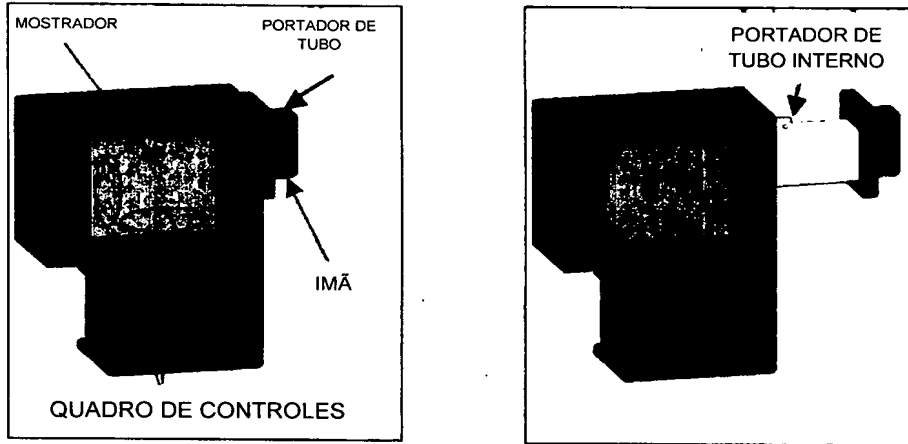


FIG. 189

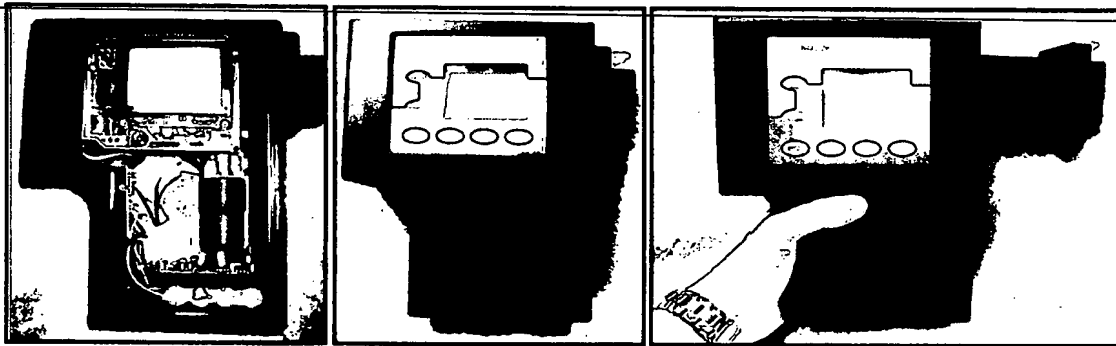


FIG. 190

RESUMOMÉTODO E APARELHO PARA DETECTAR ANTÍGENO SOLÚVEL, MÉTODO E APARELHO PARA DETECTAR PARTÍCULA ALVO E MÉTODO PARA IDENTIFICAR UMA PATOGENIA EM PLANTAS

5 A presente invenção refere-se a métodos para a detecção de partículas alvo, tais como patogenicias, antígenos solúveis, ácidos nucleicos, toxinas, produtos químicos, patogenicias de plantas, patogenicias de transmissão sanguínea, bactéria, vírus e similares. A invenção  
10 descreve ainda uma célula emissora que compreende um receptor, sendo que o receptor pode ser um anticorpo ou receptor Fc, e uma molécula emissora para detectar uma partícula alvo em uma amostra onde a partícula alvo a ser detectada é ligada por um ou mais receptores à célula  
15 emissora. São descritos ainda aparelhos sensores opticoeletrônicos para detectar uma partícula alvo em uma amostra, incluindo em uma pluralidade de amostras.